

**Abtrennung alloreaktiver Zellen aus Blut
zur Verringerung des GvHD-Risikos
bei einer Immuntherapie (Donor Lymphozyten Infusion)
nach Stammzelltransplantation**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

Von Ursula Marietta Schrey (geb. Leonhardt)
Geboren am 03. Mai 1976 in München

Erster Gutachter: Prof. Dr. F. Zintl

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. D. Barz

Dritter Gutachter: Prof. Dr. J. F. Beck

Tag der öffentlichen Verteidigung: 26. September 2006

Abkürzungsverzeichnis:

Ak	Antikörper
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
BrdU	Bromdesoxyuridin
CD	Differenzierungscluster (cluster of differentiation)
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalie-Virus
CTLA	zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen
DLI	Spenderlymphozyteninfusion (donor lymphocyte infusion)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Ethylendiamintetraacid)
FKS	fetales Kälberserum
G-CSF	Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor (granulocyte colony stimulating factor)
GvHD	Spender gegen Wirt Erkrankung (graft versus host disease)
GvL	Spender gegen Leukämie (graft versus leukemia)
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
HSA	humanes Serumalbumin
ICAM	intrazelluläres Adhäsionsmolekül
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KIR	Killerimmunglobulinähnlicher Rezeptor
LFA	funktionelles Leukozyten-Antigen
LTT	Lymphozytentransformationstest
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MHC	major Histokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MLC	gemischte Lymphozyten Kultur (mixed lymphocyte culture)
MNC	Mononukleäre Zellen (mononuclear cells)
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zelle	natürliche Killer-Zelle

NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PHA	Phytohämagglutinin
PRB	Plazenta-Restblut
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute Medium
SAA	Severe aplastic anaemia
SCF	Stammzellfaktor (stem cell factor)
SI	Stimulationsindex
TCR	T-Zell-Rezeptor
TC-Zelle	zytotoxische T-Zelle
TGF	transformierender Wachstumsfaktor
TH-Zelle	T-Helferzelle
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TPNR	Transplantationsnummer
VCAM	Gefäßzelladhäsionsmolekül (vascular cell adhesion molecule)
VLA	very late antigen

Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungsverzeichnis:	3
Inhaltsverzeichnis:	5
1. Zusammenfassung	8
2. Einleitung	10
2.1. Allgemeines zur Stammzelltransplantation	10
2.2. Das HLA-System.....	10
2.3. Funktionen des HLA/TCR	12
2.4. Zusammenhang zwischen HLA und GvHD bei Stammzelltransplantationen .	16
2.5. Klinik der GvHD	18
2.6. Biologische Methoden zur Testung der Spender-Empfänger-Kompabilität....	19
2.7. Übertragung T-zelldepletierter CD34+ Stammzellen.....	20
2.8. Möglichkeiten der T-Zell-Modifikation vor DLI	21
2.9. Zellseparation	22
3. Ziele der Arbeit	24
4. Methodik	25
4.1. Material	25
4.1.1. Spenderdaten	27
4.2. Methoden	28
4.2.1. Herstellung des Normalserumpools.....	28
4.2.2. Herstellung von RPMI-Medium.....	29
4.2.3. Herstellung mononukleärer Zellen (MNC)	29
4.2.4. Kryokonservation und Auftauen kryokonservierter Zellen	29
Einfrieren mononukleärer Zellen	29
Auftauen mononukleärer Zellen	30
4.2.5. Ansetzen einer gemischten Lymphozyten-Kultur.....	30
Verstärkung der MLC-Reaktivität zur Erhöhung der Sensitivität	30
4.2.6. Durchflußzytometrie zur Bestimmung der CD-69-Expression	30
4.2.7. BrdU-Einbautest zur Ermittlung der Zell-Proliferationsrate	31
4.2.8. Thymidin-Einbau-Assay zur Messung der Zellproliferation nach Aktivierung durch fremde mononukleäre Zellen vor und nach der Zellseparation	32
4.2.9. Zellseparation zur Abtrennung aktivierter Zellen	32

4.2.10. Lymphozytentransformationstest zur Bestimmung des Funktionsniveaus der Zellen	35
4.2.11. Statistische Methoden	36
5. Ergebnisse	37
5.1. Ermittlung des optimalen Separationszeitpunktes	37
5.1.1. Die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 nach HLA-Antigenstimulation	37
5.1.2. Die Proliferationsinduktion nach HLA-Antigenstimulation	39
5.2. Untersuchungen zur Möglichkeit einer Verstärkung der MLC-Antwort.....	40
5.3. Untersuchungen zur HLA-Reaktivität und zur Zellfunktion vor und nach Separation.....	41
5.3.1. Untersuchungen zur Zellfunktion vor und nach Separation	42
5.3.2. Bestimmung der HLA-Reaktivität und der Anzahl der HLA-aktivierten Zellen vor und nach Separation.....	43
Ergebnisse der MLC	43
Ergebnisse der Durchflußzytometrie.....	44
5.3.3. Untersuchungen zur HLA-Bindung der Zellseparation	45
5.3.4. Untersuchungen zur MLC-Verstärkung nach Separation	46
5.4. Modell für haploidentische Spender/Empfänger Paarungen	47
5.4.1. CD69-Expression nach HLA-Antigenstimulation mit teilidentischer Zellen	47
5.4.2. Untersuchungen zur MLC-Verstärkung bei teilidentischen Zellen	52
5.5. Retrospektive Untersuchung zur HLA-Reaktivität von teilidentisch und identisch transplantierten Patienten/Spender Paarungen	53
5.5.1. MLC-Verstärkung bei teilidentischen Patienten/Spender Paarungen	53
5.5.2. MLC-Verstärkung bei HLA-identischen Patienten/Spender Paarungen ..	56
5.5.3. Separation bei teilidentisch transplantierten Patienten	58
6. Diskussion	60
6.1. Ermittlung des optimalen Separationszeitpunktes	61
6.1.1. Die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 nach HLA-Antigenstimulation	61
6.1.2. Die Proliferationsinduktion nach HLA-Antigenstimulation	63
6.2. Untersuchungen zur Möglichkeit einer Verstärkung der MLC-Antwort.....	63

6.3. Untersuchungen zur Zellfunktion und zur HLA-Reaktivität vor und nach Separation.....	64
6.3.1. Untersuchungen zur HLA-Bindung der Zellseparation	68
6.3.2. Untersuchungen zur Rest-HLA-Reaktivität nach Separation	69
6.4. Modell für haploidentische Paarungen	70
6.4.1. CD69-Expression bei teilidentischen Zellen nach HLA-Antigenstimulation	70
6.4.2. Untersuchungen zur MLC-Verstärkung bei teilidentischen Zellen	72
6.5. Untersuchungen an Zellen teilidentisch und identisch transplantierten Patienten.....	73
6.5.1. MLC-Verstärkung bei teilidentisch und identisch transplantierten Patienten	73
6.5.2. Separation bei teilidentisch transplantierten Patienten mit GvHD.....	74
7. Schlussfolgerungen	76
8. Literaturverzeichnis.....	77
9. Anhang	97
Lebenslauf:	97
Danksagung.....	98
Ehrenwörtliche Erklärung:	99

1. Zusammenfassung

Die Spender gegen Wirt Erkrankung (graft versus host disease, GvHD) ist eine der schwerwiegendsten Komplikationen nach HLA-teilidentischen und -identischen Stammzelltransplantationen. Um diesem Problem zu begegnen, werden T-zelldepletierte Transplantate gegeben. Jedoch kommt es hierbei zum vermehrten Auftreten von Transplantatversagen, Infektionen und Tumorrezidiven. Zur Vermeidung dieser Komplikationen werden daher Donor-Lymphozyteninfusionen (DLI) in bestimmten Abständen nach Transplantation durchgeführt, wobei es aber wiederum zu einer höheren Rate an GvHD kommt. Ein weiteres Problem besteht darin vorherzusagen, mit welcher Wahrscheinlichkeit eine GvHD auftritt, um präventive Maßnahmen gezielt einsetzen zu können. Auch eine HLA-identische Transplantation kann dies nicht verhindern. Allerdings bieten auch die meisten serologischen Methoden keine wirkliche Ergänzung zur HLA-Typisierung.

Wir untersuchten in der vorliegenden Arbeit in vitro die Möglichkeiten einer Modifizierung der Donor-Lymphozyteninfusion zur Verringerung des GvHD-Risikos bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der T-Zell-Funktion. Des Weiteren versuchten wir, eine gemischte Lymphozytenkultur (mixed lymphocyt culture, MLC) so zu optimieren, dass anhand ihrer Ergebnisse eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer GvHD getroffen werden kann.

Hierzu brachten wir Zellen gesunder nicht verwandter Spender, sowie teilidentischer Empfänger/Spender-Paare in einer MLC zusammen. Nach vier Tagen führten wir eine Zellseparation anhand des Aktivierungsmarkers CD69 durch und trennten damit die alloreaktiven Zellen ab. Wir bestimmten den Stimulationsindex und die Prozentzahl der CD69-positiven Zellen nach Separation und ohne Separation. Zur Testung der Zellfunktion verwendeten wir einen Lymphozytentransformationstest (LTT). Um eine sensitivere MLC zu erhalten, verstärkten wir diese mit den Wachstumsfaktoren SCF und IL-2 und bestimmten den Stimulationsindex mit und ohne Verstärkung. Die MLC-Verstärkung führten wir an Zellen fremder Spender und an bereits transplantierten HLA-teilidentischen und identischen Empfänger/Spender-Paarungen durch.

Wir fanden, dass sich durch die Abtrennung alloreaktiver Zellen anhand des Aktivierungsmarkers CD69 die MLC-Reaktivität statistisch signifikant verringern ließ.

Dies fand sich sowohl bei fremden, als auch bei teilidentischen Paarungen. Bei den fremden Spendern fand sich zudem noch ein statistisch signifikanter Rückgang der CD69-positiven Zellen nach Separation. Die Zellfunktion, die mittels eines LTT bestimmt wurde, zeigte ohne und nach Separation keinen statistisch signifikanten Unterschied. Bei fremden Zellen konnten wir durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren in der MLC eine statistisch signifikante Erhöhung des Stimulationsindex messen. Um zu testen, ob dies nur eine allgemeine Hochregulation darstellt, oder tatsächlich eine genauere Aussage über eine evtl. zu erwartende GvHD erlaubt, führten wir diese Untersuchungen auch an Zellen bereits transplanterter HLA-teilidentischer und -identischer Empfänger/Spender-Paarungen durch, bei denen bekannt war, ob sie eine GvHD erlitten hatten. Hierbei zeigte sich, dass eine Steigerung der MLC-Antwort nur bei denjenigen Paarungen zu erzielen war, bei denen der Empfänger tatsächlich an einer GvHD erkrankt war.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist anhand des Aktivierungsmarkers CD69 alloreaktive Zellen magnetisch abzutrennen, ohne die Zellfunktion der verbleibenden Zellen stark in Mitleidenschaft zu ziehen. Des Weiteren konnten wir darstellen, dass durch eine Verstärkung der MLC mit Wachstumsfaktoren diese sensibler bzgl. der Aufdeckung geringer HLA-Differenzen und damit der Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer GvHD ist. Diese Ergebnisse eröffnen die Möglichkeit, Patienten nach Stammzelltransplantation von T-zelldepletierten Transplantaten höhere Dosen an Donorlymphozyten zu infundieren, um ein schnelleres Anwachsen der transplantierten Zellen ein rascheres Einsetzen der Immunkompetenz und eine geringere Rezidivrate bei malignen Erkrankungen zu erreichen, ohne die Gefahr des Auftretens einer GvHD zu sehr zu erhöhen. Zudem könnte man unter Umständen bereits vor Transplantation diejenigen Patienten bestimmen, die ein erhöhtes Risiko aufweisen, an einer GvHD zu erkranken, und daher eine intensivere GvHD-Prophylaxe benötigen bzw. nur eine geringere Anzahl an Donorlymphozyten erhalten sollten. Bei einer Auswahl mehrerer potentieller Spender wäre auch die Bestimmung des am besten Geeigneten möglich. All diese Ergebnisse bedürfen jedoch noch einer Überprüfung in klinischen Studien.

2. Einleitung

2.1. Allgemeines zur Stammzelltransplantation

Für viele Krankheiten, wie Erkrankungen des Immunsystems, maligne Erkrankungen oder Stoffwechseldefekte, stellt die Transplantation von Stammzellen die einzige kurative Therapie dar (Armitage 1994; Thomas *et al.* 1986). Seit der ersten erfolgreichen Knochenmarkstransplantation im Jahre 1966 in Seattle/USA, der ersten autologen Knochenmarkstransplantation bei einem Kind im Jahre 1968 und der ersten Knochenmarkstransplantation in Deutschland 1975, ist diese Therapiemöglichkeit immer weiterentwickelt worden.

Für die Stammzellübertragung nach myeloablativer Chemotherapie oder Bestrahlung werden zurzeit im klinischen Alltag Zellen aus Knochenmark, Plazenta-Restblut und mit Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor (G-CSF) mobilisierte periphere Blutstammzellen genutzt. Bei der Übertragung von Stammzellen werden neben einem kompletten hämatopoetischen System auch immunkompetente Zellen, deren Funktion in der Unterscheidung zwischen „selbst und nicht-selbst“ und damit in der Bekämpfung von Erkrankungen durch Erreger oder entartete eigene Körperzellen besteht, weitergegeben. Somit ergibt sich bei jeder Stammzelltransplantation das Problem, dass der Körper des Empfängers von dem übertragenen Immunsystem des Spenders als fremd erkannt werden kann. Dies wird über das „human leukocyte antigen“ (HLA) –System vermittelt.

2.2. Das HLA-System

Der menschliche Major Histokompatibilitäts-Komplex (MHC) wurde erstmals in den frühen 50er Jahren beschrieben (Dausset 1954). MHC Klasse I-Moleküle mit den Genloci HLA-A, -B, -C finden sich auf allen kernhaltigen Zellen im Körper und dienen als Rezeptor für zytotoxische T-Lymphozyten. Zudem gibt es noch HLA-E, -F, -G, die ebenfalls dem MHC Klasse I-Komplex angehören und eine sehr unterschiedliche Verbreitung in verschiedenen Geweben und auf verschiedenen Zellen zeigen. MHC

Klasse II-Moleküle mit den Genloci HLA-DR, -DQ, -DP treten hingegen nur auf Oberflächen von B-Zellen, Makrophagen und spezialisierten Endothelzellen auf und stellen die Erkennungsmerkmale für T-Helfer(TH-) Zellen dar. Ursprünglich wurden Klasse I Moleküle serologisch über eine Reaktivität mit Alloantisera und Klasse II Moleküle über eine Reaktivität in funktionellen serologischen Tests definiert (Bach und Hirschhorn 1964; Bain *et al.* 1964). Die MHC Moleküle dienen dem Körper zur Selbsterkennung. Das MHC Molekül ist ein Heterodimer, das prinzipiell aus vier Ketten α , β , γ und δ zusammengesetzt sein kann. Dabei werden immer α und β oder γ und δ miteinander kombiniert. Das MHC-Molekül hat eine Spalte, die seitlich von 2 α -Helices und am Boden durch eine β -Faltblattstruktur begrenzt ist. In dieser Spalte werden die Antigene gebunden, die dort dann dem T-Zell-Rezeptor (TCR) präsentiert werden. T-Zellen üben im Rahmen der zellulären Immunantwort, sowie bei der Aktivierung von B-Zellen vielschichtige Funktionen aus und spielen auch bei der Entstehung einer GvHD oder einer Transplantatabstoßung nach Stammzelltransplantation eine bedeutende Rolle. Sie müssen in der Lage sein ein spezifisches Antigen in Verbindung mit definierten Membranbestandteilen körpereigener Zellen (MHC) zu erkennen.

Unter HLA-Identität versteht man die völlige Übereinstimmung von Spender und Empfänger bezüglich der Aminosäuresequenzen, die von den klassischen HLA-Genorten (A, B, C, DRA1, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQA1, DQB1, DPA1 und DPB1) kodiert werden.

Die Spenderauswahl erfolgt heute über eine Bestimmung der HLA-A, -B, C, DQB1 und -DRB1 Antigene mittels serologischer und molekulargenetischer Typisierung, wobei bei Übereinstimmung vor Transplantation noch eine Feintypisierung der HLA-Subklassen durchgeführt wird (Anasetti *et al.* 1989; Beatty *et al.* 1991; Beatty *et al.* 1993; Kernan *et al.* 1993). Es ist auch bei HLA-identisch getesteten Spendern unklar, ob diese tatsächlich HLA-identisch sind, da HLA-B meist nur niedrig auflösend und HLA-DRA1, -DRB3, -DRB4, -DQA1, -DPA1, -DRB5 und -DPB1 oft überhaupt nicht getestet werden. Bei Blutsverwandten spricht man von einer genotypischen HLA-Identität, ansonsten von einer phänotypischen HLA-Identität. Die Übereinstimmung in den Allelen ist in der Kernfamilie (Geschwister und Eltern des Patienten) am größten und nimmt mit abnehmendem Verwandtschaftsgrad immer weiter ab, wobei sie bei Fremd Spendern trotz Übereinstimmung im getesteten Bereich des HLA-Systems am geringsten ist (Begovich und Erlich 1995). Bei HLA-teilidentischen verwandten

Spendern ist eine HLA-Differenz an einem der Genorte HLA-A, -B, -DRB1 oder – DQB1 in GvH- und/oder HvG-Richtung prinzipiell akzeptabel. Dies schließt jedoch nicht aus, dass in speziellen Einzelfällen für individuelle Heilversuche auch nicht verwandte Spender mit HLA-Differenzen an einem Genort (Ash *et al.* 1990; Beatty *et al.* 1993) oder Spender mit HLA-Differenzen an mehreren Genorten herangezogen werden können.

2.3. Funktionen des HLA/TCR

Bei einer bakteriellen Infektion werden die von den antigenpräsentierenden Zellen (Makrophagen und dendritische Zellen) der angeborenen Immunität aufgenommenen Antigene von diesen zusammen mit MHC-Klasse-II Molekülen auf deren Oberfläche präsentiert. Sie wandern dann nach einigen Tagen in lymphatische Gewebe ein, wo sie bei Übereinstimmung der Antigenerkennung spezifische T-Zellen aktivieren. Eine virale Infektion kann, da sie intrazellulär abläuft nicht von Makrophagen erkannt werden. In einem solchen Fall werden Bestandteile der Viren an der Zelloberfläche im Zusammenhang mit MHC Klasse I Molekülen präsentiert und können dadurch von Zellen der angeborenen und erworbenen Immunität erkannt werden.

Eine entscheidende Rolle spielt hierbei der T-Zell-Rezeptor, der der Bindung der T-Zellen an die mit ihrem spezifischen Antigen beladenen MHC Moleküle dient. Er lässt sich in einen Typ $\alpha\beta$ und in einen Typ $\gamma\delta$ einteilen. Der Typ $\alpha\beta$ stellt den zahlenmäßig deutlich überwiegenden Teil der T-Zell-Rezeptoren dar und findet sich sowohl auf zytotoxischen T-Zellen, als auch auf T-Helferzellen. Die beiden Polypeptidketten dieses Rezeptors sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden und ragen beide in das Zytoplasma der Lymphozyten. Die extrazellulären Anteile beider Ketten bestehen aus einer konstanten (C) Region, einer variablen (V) Region und einer Verbindungsregion (J), wobei die β -Kette zusätzlich noch eine D-Region besitzt. Aufgrund der vielen verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten der V-D-J-Gene sind rein theoretisch 10^7 verschiedene Rezeptorkonstellationen und damit ebenso viele verschiedene Antigen-Spezifitäten möglich. Der $\alpha\beta$ -Rezeptor erfüllt Funktionen im Rahmen der Antigenerkennung. Der $\gamma\delta$ Rezeptortyp ist weitaus seltener und tritt vermehrt bei T-Zellen auf, die weder zu den zytotoxischen T-Zellen, noch zu den T-Helferzellen gehören. Von diesem Rezeptortyp existieren 3 verschiedene Formen,

die sich in ihrer γ -Kette unterscheiden. Die 3 verschiedenen Typen der γ -Kette sind durch unterschiedliche Glykosylierung, die Existenz oder das Fehlen von Disulfidbrücken und verschiedene Peptidanteile gekennzeichnet. Ebenso wie der $\alpha\beta$ -Typ weist auch der $\gamma\delta$ -Typ in beiden Ketten einen zytoplasmatischen Anteil und extrazelluläre C-, V-, D- und J-Regionen auf. Trotz der deutlich geringeren Anzahl der V-Gensequenzen des $\gamma\delta$ -Rezeptortyps, im Vergleich zum $\alpha\beta$ -Rezeptortyp, könnte die Anzahl der möglichen Rezeptortypen aufgrund der „ungenauen“ Zusammensetzung der V-J-Paarungen durchaus an die des $\alpha\beta$ -Types heranreichen. Die Funktion des $\gamma\delta$ -Rezeptortypes ist noch weitestgehend ungeklärt, jedoch ist es möglich, dass $\gamma\delta$ -Zellen bei der Ausreifung der späteren $\alpha\beta$ -Zellen im Thymus eine Rolle spielen. Die Reifung und Entwicklung der Selbsttoleranz und MHC-Erkennung der T-Zellen findet hauptsächlich im Thymus statt, jedoch sind auch extrathymale Reifungsprozesse durchaus von Bedeutung (Knobloch *et al.* 1991).

Verschiedene Oberflächenstrukturen auf den Zellen werden auch mit dem Begriff Differenzierungskluster (CD) bezeichnet. Bei der Erkennung eines Antigen-MHC-II-Komplexes durch T-Zellen kommt es zu einer LFA-1-Aktivierung und zu einer Bindung der T-Zelle an die antigenpräsentierende Zelle. Dies führt zu einer klonalen Vermehrung und Differenzierung der spezifischen T-Zelle, wobei entweder T-Effektorzellen oder T-Gedächtniszellen entstehen. Sowohl CD4 Helferzellen, als auch CD8 zytotoxische T-Zellen können ein spezifisches Antigen in Verbindung mit einem MHC-Klasse-II oder MHC-Klasse-I Komplex erkennen und dadurch aktiviert werden. Je nachdem welche Zytokine vorherrschen, werden CD4 Zellen nach Aktivierung entweder zu TH1 oder zu TH2 Zellen. Interleukin (IL)-12 und Interferon (IFN) γ fördern die Entstehung von TH1 Zellen. IL-4 und IL-6 fördern die Entstehung von TH2 Zellen. TH1 Zellen führen zu einer Makrophagenaktivierung und TH2 Zellen rufen eine B-Zellaktivierung hervor. Auch CD8 T-Zellen greifen über eine Zytokinproduktion in die Ausreifung und Aktivierung von CD4 T-Zellen ein. So produzieren sie IFN- γ und bewirken damit eine Hemmung der Proliferation von TH2 Zellen. Diese CD8 Zellen werden daher auch zytotoxische T (TC) 1 Zellen genannt. Die TC2 Zellen produzieren IL-10 und transformierenden Wachstumsfaktor(TGF)- β und hemmen damit die Proliferation von TH1 Zellen, was auch durch IL-4 bewirkt wird.

Ausdifferenzierte T-Zellen verlassen das lymphatische Gewebe und wandern in infiziertes Gewebe ein. Diese Wanderung wird durch die vermehrte Expression von

very late Antigen (VLA) -4 Rezeptoren auf den T-Zelle gefördert. Die VLA-4 Rezeptoren binden an Gefäßzell-Adhäsionsmolekül-1-Rezeptoren (VCAM) an Endothelzellen und dies führt zu einer Extravasation von T-Zellen. T-Effektorzellen verstärken diesen Vorgang noch durch die Produktion von Tumornekrosefaktor (TNF) - α , welcher die Bildung von VCAM-1 und ICAM-1 auf Endothelzellen induziert und damit sowohl die Extravasation von T-Effektorzellen, als auch die Einwanderung von naiven T-Zellen in lymphatisches Gewebe fördert. Bei jeder Zellaktivierung wird von der aktivierten Zelle in der Frühphase CD69 als Aktivierungsmarker exprimiert. Die Erkennung von „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ durch das Immunsystem ist von entscheidender Bedeutung für den Organismus, da es bei fehlender Selbsterkennung zu den gleichen Abläufen gegen den eigenen Körper kommt, die auch bei der Infektabwehr auftreten und es zu einer Schädigung des eigenen Gewebes kommen kann. Die Selbsttoleranzentwicklung beim Menschen beginnt bereits in der Fetalzeit und führt zu einer Inaktivierung oder klonalen Deletion von Lymphozyten, die körpereigene Antigene binden. Bei T-Zellen findet dieser Vorgang v.a. im Thymus statt und ist bei Geburt schon weitestgehend abgeschlossen. Bei B-Zellen findet die Ausdifferenzierung im Knochenmark und in lymphatischen Geweben statt. Die Mechanismen der Selbsterkennung und Selbsttoleranz sind auch bei der Transplantation von Organen oder Stammzellen und der Vermeidung bzw. Bekämpfung der damit verbundenen Komplikationen von entscheidender Bedeutung (Janeway Ch.A. *et al.* 2002).

Eine Abstoßungsreaktion nach Organtransplantation ist meist T-Zell vermittelt und durch eine Alloreaktivität der Empfängerzellen bedingt. Unter Alloreaktivität versteht man die Reaktivität gegen Antigene, die sich bei verschiedenen Individuen derselben Spezies unterscheiden. Eine Abstoßungsreaktion richtet sich meist über eine Bindung von T-Effektorzellen des Empfängers gegen MHC Klasse-I-Antigene des Transplantates. Jedoch spielen auch Minorhistokompatibilitätsantigene eine Rolle. Bei Erkennung von MHC-Molekülen des Transplantates durch den Empfänger spricht man von direkter allogenspezifischer Erkennung, bei Erkennung von Proteinen des Spenders, die in Verbindung mit antigenpräsentierenden Zellen des Empfängers auftreten, von indirekter allogenspezifischer Erkennung. Man unterscheidet 3 Formen von Abstoßungsreaktionen. Eine hyperakute, durch Alloantikörper des Empfängers gegen den Spender nach Minuten bis Stunden, eine akute durch antigenpräsentierende Zellen des Spenders und einer damit verbundenen

Empfänger-T-Zellaktivierung nach Tagen oder Wochen und eine chronische nach Monaten oder Jahren.

Auch bei einer Stammzelltransplantation gibt es analog zur Transplantation solider Organe eine direkte allogenspezifische Erkennung von antigenpräsentierenden Zellen des Empfängers durch T-Zellen des Spenders und eine indirekte allogenspezifische Erkennung von Empfänger-Peptiden, die auf antigenpräsentierenden Zellen des Spenders in Verbindung mit MHC-Molekülen des Spenders erscheinen, durch T-Zellen des Spenders. Bei einer GvHD, die durch Minorhistokompatibilitätsantigene ausgelöst wird, ist die direkte Erkennung vorherrschend (Shlomchik *et al.* 1999). Bei Entfernung aller reifen T-Zellen aus dem Transplantat tritt keine GvHD auf, da die aus dem Spenderknochenmark im Empfänger reifenden T-Lymphozyten im weiteren Verlauf eine Toleranz gegenüber dem Empfänger entwickeln. Jedoch treten bei diesem Vorgehen andere Probleme auf, so dass auch damit keine optimale Therapieoption gegeben ist. Eine wichtige Aufgabe der reifen Spender-T-Zellen bei Knochenmarkstransplantationen im Rahmen von malignen Erkrankungen des blutbildenden Systems ist die Graft versus Leukämie (GvL)-Reaktion. Hierbei kommt es durch Erkennung von Minorhistokompatibilitätsantigenen oder tumorspezifischen Antigenen, wie z.B. der B-Zell-Linien-Marker HB-1 auf akuten lymphoblastischen Leukämiezellen, durch T-Zellen des allogenen Knochenmarks zu einer Vernichtung der Leukämiezellen durch Donorzellen (Janeway Ch.A. *et al.* 2002). Die akute GvHD läuft prinzipiell in drei Stufen ab. In der ersten Stufe kommt es durch die Konditionierung zu einer Aktivierung antigenpräsentierender Zellen des Empfängers, zu einer Ausschüttung von Zytokinen wie TNF- α und IL-1 (Xun *et al.* 1994) und zu einem Epithelschaden im Gastrointestinaltrakt. Es gibt einen engen Zusammenhang zwischen Intensität der Konditionierung, Zytokinaktivität und GvHD (Gale *et al.* 1987; Clift *et al.* 1990; Hill *et al.* 1997). In der zweiten Stufe kommt es zu einer Spender T-Zellaktivierung durch antigenpräsentierende Zellen in den lymphatischen Organen (Teshima *et al.* 2002; Shlomchik *et al.* 1999; Korngold und Sprent 1980). Bei Differenzen in MHC-Klasse I Molekülen kommt es bevorzugt zu einer Aktivierung von CD8 Zellen, bei MHC-Klasse II Differenzen zu einer Stimulation von CD4 Zellen (Sprent *et al.* 1988). Die dritte Stufe ist durch eine Reaktion der aktivierten Effektorzellen gegen Zielgewebe gekennzeichnet. An dieser Effektorphase sind Zytokine, zytotoxische T-Zellen, große granuläre Lymphozyten, NK-Zellen und Stickstoffmonoxid (NO) beteiligt.

Inflammatorische Zytokine wirken mit zytotoxischen T-Zellen zusammen und bewirken eine lokale Gewebsschädigung, die bis zum Funktionsverlust des betroffenen Organs gehen kann. Eine entscheidende Rolle in vielen Phasen der GvHD haben die Zytokine Tumornekrosefaktor-(TNF)- α und IL-2. TNF- α kann dendritische Zellen zur vermehrten Alloantigenpräsentation anregen, Effektor T-Zellen, neutrophile Granulozyten und Monozyten über die Induktion von Chemokinen in die Zielorgane bringen und auf direktem Weg eine Apoptose oder Nekrose der Zielzellen bewirken. Des Weiteren ist TNF- α auch über TNFR-(Tumornekrosefaktor-Rezeptor)-1 und TNFR-2 direkt an der T-Zellaktivierung beteiligt (Hill *et al.* 2000). Das von Makrophagen, die im Rahmen der GvHD aktiviert sind, produzierte NO kann direkte Gewebeschäden hervorrufen und hemmt zudem Reparaturmechanismen der Zielorgane (Nestel *et al.* 2000). Das genaue Zusammenspiel aller an einer GvHD beteiligten Zellen und Zytokine ist im Einzelnen noch Gegenstand aktueller Forschungen.

2.4. Zusammenhang zwischen HLA und GvHD bei Stammzelltransplantationen

Bis in die 90er Jahre des 20. Jahrhunderts bestand bei Transplantation von HLA-identischen Fremd Spendern ein deutlich höheres GvHD-Risiko und es wurden keine besseren Therapieerfolge, als bei Transplantation von HLA-teilidentischen verwandten Spendern erzielt (Anasetti *et al.* 1989; Beatty *et al.* 1991; Beatty *et al.* 1993; Henslee-Downey *et al.* 1997; Kaminski 1989; Kernan *et al.* 1993; Marks *et al.* 1993; McGlave *et al.* 1987; McGlave *et al.* 1993; Storb *et al.* 1986). In den letzten Jahren hat sich dies durch genauere Möglichkeiten der HLA-Typisierung und neue Methoden bei der Durchführung der Transplantation jedoch geändert. Die krankheitsfreie Überlebensrate bei Patienten nach Stammzelltransplantation von nicht verwandten Fremd Spendern betrug noch vor einigen Jahren nur 35% (al Daccak *et al.* 1990a; Mackinnon *et al.* 1995) und ist heute bereits deutlich angestiegen. Es konnte gezeigt werden, dass die fehlende Übereinstimmung bei MHC Klasse I-Molekülen mit einer erhöhten Rate an GvHD einhergeht (Barnardo *et al.* 1996; Santamaria *et al.* 1994), wobei eine geringere Inzidenz zwischen GvHD und einer fehlenden Übereinstimmung im Bereich der Allele, die für MHC Klasse II kodieren, gefunden wurde (al Daccak *et al.* 1990b; Pawelec *et al.* 1986).

Neben der GvHD, die durch T-Zellen vermittelt wird, gibt es weitere Komplikationen im Rahmen einer Knochenmarkstransplantation, wie Transplantatabstoßung, Infektionen durch Viren, Bakterien oder Pilze und Rezidive maligner Erkrankungen, die durch T-Zell-Gaben des Spenders bekämpft werden können (al Daccak *et al.* 1990a; Depil *et al.* 2004; Kolb *et al.* 2002; Marks *et al.* 2002; Slavin *et al.* 2002; Vela-Ojeda *et al.* 2004), wobei eine positive Korrelation zwischen der Dosis der übertragenen T-Zellen und dem Auftreten einer GvHD gefunden wurde (al Daccak *et al.* 1990a; Mackinnon *et al.* 1995; Vela-Ojeda *et al.* 2004).

Neben der Transplantation von komplettem Knochenmark, peripheren Blutstammzellen oder Plazenta-Restblut nach myeloablativer Konditionierung wird, in letzter Zeit, zur Verminderung der transplantationsbezogenen Mortalität durch Infektionen, Multiorganversagen oder GvHD, immer mehr auf Transplantationen nach nicht-myeloablativer Konditionierung und die Übertragung von T-zelldepletierten CD 34⁺ Stammzellen zurückgegriffen. Dies ist auch deshalb der Fall, da vor allem bei älteren Patienten eine komplette myeloablative Therapie aufgrund ihrer Multimorbidität nicht in Frage kommt und für nur ca. 25%-30% der Patienten, für die eine Stammzelltransplantation in Frage kommt, einen HLA-identischer verwandter oder fremder Spender zur Verfügung steht (Henslee-Downey *et al.* 1997). Obwohl durch die Übertragung T-zelldepletierter Stammzellen das Risiko einer GvHD auch bei Abweichungen im HLA-System minimiert werden konnte (Ash *et al.* 1990; Henslee-Downey *et al.* 1997; Soiffer *et al.* 1992), zeigte sich, dass es hierbei vermehrt zu Rezidiven, Transplantatabstoßungen und Infektionen kam (Goldman *et al.* 1988; Hessner *et al.* 1995; Marmont *et al.* 1991). Bei einer inkompletten Konditionierung vor Transplantation konnten zwar die Frühkomplikationen, die durch die myeloablative Therapie und Immunsuppression bedingt waren reduziert werden, jedoch kam es vermehrt zum Auftreten von inkompletten Chimerismen, Transplantatabstoßungen und Rezidiven maligner Erkrankungen. Sowohl bei der Transplantation von T-zelldepletierten CD34⁺ Stammzellen, als auch bei einer Stammzelltransplantation nach inkompletter Konditionierung konnten die Komplikationen durch DLI reduziert werden, jedoch mit der Gefahr des Auftretens einer GvHD.

2.5. Klinik der GvHD

Die GvHD ist eine der Hauptkomplikation nach Transplantation von Knochenmark oder Stammzellen, die eine entscheidende Rolle bei der transplantationsbedingten Morbidität und Mortalität spielt (Ringden *et al.* 1988; Storb *et al.* 1986). Klinisch lässt sich anhand des Zeitpunktes des Auftretens in den betroffenen Organen und in der Art des Organbefalls eine akute von einer chronischen GvHD unterscheiden. Zur Prophylaxe werden meist Methotrexat und Cyclosporin A alleine oder in Kombination eingesetzt.

Die akute GvHD tritt für gewöhnlich in den ersten 2 Monaten nach Transplantation auf (Baughan *et al.* 1984; Thomas *et al.* 1986). Als Risikofaktoren für eine GvHD sind eine steigende Anzahl der HLA-Differenzen, höheres Alter des Patienten (Gluckman *et al.* 1981; Ringden und Nilsson 1985; Storb *et al.* 1977; Storb und Thomas 1983), höheres Alter des Spenders, männliche Patienten mit weiblichem Spender (Gale *et al.* 1987), insbesondere, wenn der Spender durch vorangegangene Schwangerschaften geprägt wurde (Atkinson *et al.* 1986), insuffiziente Keimdekontamination vor Transplantation (van Bekkum und Knaan 1977) und Monotherapie mit Methotrexat oder Cyclosporin A (Ringden 1986) bekannt. Die akute GvHD manifestiert sich vor allem an der Haut, der Leber, dem Gastrointestinaltrakt und den lymphatischen Organen (Glucksberg *et al.* 1974; Sale *et al.* 1977). Die akute GvHD wird klinisch in 4 Stadien von I bis IV eingeteilt (Glucksberg *et al.* 1974). Im Stadium I zeigt sich eine lokalisierte Hautrötung, im Stadium IV eine lebensbedrohliche Beteiligung eines oder mehrerer Organe, die meistens zum Tode führt. Therapeutisch werden Prednisolon, Methylprednisolon, Antithymozytenglobulin, monoklonale Antikörper gegen T-Zellen, Cyclosporin A, FK506, Thalidomid, Psoralen + UV-Licht und anti-IL-2 Antikörper genutzt (Deeg *et al.* 1985; Groth *et al.* 1979; Herve *et al.* 1991; Hymes *et al.* 1985; Vogelsang *et al.* 1988; Weiden *et al.* 1978).

Ursprünglich wurde die chronische GvHD als eine GvHD definiert, die mehr als 100 Tage nach Transplantation auftritt, jedoch sind Fälle berichtet, in denen eine chronische GvHD bereits 31 Tage nach Transplantation aufgetreten ist (Ringden *et al.* 1985). Als Risikofaktoren für eine chronische GvHD kommen eine akute GvHD, hohes Patientenalter, eine Spender T-Lymphozyten-Gabe (Donor Lymphozyte Infusion, DLI) nach Transplantation (Storb *et al.* 1986) und CMV-Infektionen beim

Empfänger (Lonnqvist *et al.* 1990) oder beim Spender in Frage. Die chronische GvHD manifestiert sich an der Haut, der Leber, der Mundschleimhaut, dem Gastrointestinaltrakt, den Augen und anderen Organen (Corson *et al.* 1982; Gomez-Garcia *et al.* 1988; Ralph *et al.* 1984; Reyes *et al.* 1983; Roca *et al.* 1982; Ruutu *et al.* 1988; Shulman *et al.* 1980; Smith *et al.* 1983; Sullivan *et al.* 1981; Sullivan *et al.* 1988; Wyatt *et al.* 1984). Therapeutisch werden Prednisolon, Azathioprin, Cyclosporin A, UV-Licht und Thalidomid genutzt (Hymes *et al.* 1985; Socie *et al.* 1990; Sullivan *et al.* 1988; Vogelsang *et al.* 1988; Wingard *et al.* 1989).

Wenn sich eine chronische GvHD direkt an eine akute GvHD anschließt, spricht man von progressiver GvHD, wenn zwischen akuter GvHD und chronischer GvHD ein freies Intervall ist, spricht man von quiescenter GvHD, und wenn eine chronisch GvHD ohne vorangegangene akute GvHD auftritt, wird dies als spricht de novo GvHD bezeichnet (Sullivan *et al.* 1981).

2.6. Biologische Methoden zur Testung der Spender-Empfänger-Kompatibilität

Neben der HLA-Typisierung kommen auch noch biologische Methoden zum Einsatz, um die Übereinstimmung von Spender und Empfänger vor Transplantation zu testen. Eine Methode, die genutzt wurde, um das Risiko einer GvHD oder einer Transplantatabstoßung vor Transplantation abschätzen zu können, war das Anlegen einer MLC zwischen mononukleären Zellen des Spenders und des Empfängers (Bach 1976; Baxter-Lowe *et al.* 1992; Dupont und Good 1975). Die MLC ist ein *in vitro* Test, der die Proliferation von Zellen als Ausdruck einer Fremderkennung misst. Jedoch waren hohe Reaktivitäten in der MLC, insbesondere bei Transplantaten von Fremd Spendern, nicht immer mit dem Auftreten einer GvHD korreliert und umgekehrt war eine niedrige Reaktivität kein sicherer Anhalt gegen diese (al Daccak *et al.* 1990a; DeGast *et al.* 1992; Feig *et al.* 1976; Kaminski *et al.* 1989; Mickelson *et al.* 1993; Mickelson *et al.* 1994; Mickelson *et al.* 1996; Ollier *et al.* 1981). Dies mag z.T. darauf zurückzuführen sein, dass die MLC durch Leukämie-Assoziierte Antigene stimuliert werden kann (Fefer *et al.* 1974; Fridman und Kourilsky 1969; Gutterman *et al.* 1972; Gutterman *et al.* 1973) oder dass der Empfänger durch vorangegangene Bluttransfusionen bereits gegen den Spender sensibilisierte Zellen besitzt. Jedoch gibt es auch Untersuchungen, die diese Hypothesen nicht unterstützen (DeGast *et*

al. 1992; Feig *et al.* 1976). Deshalb wurden Methoden erarbeitet, bei denen durch Zugabe von Zytokinen zu der MLC deren Sensitivität bezüglich der Entstehung einer GvHD verbessert werden konnte (Bishara *et al.* 1994; Bishara *et al.* 1999). In einem anderen Ansatz wurden die Mengen an Zytokinen, die in einer MLC zwischen Spender und Empfänger entstanden, gemessen und es konnte eine positive Korrelation zwischen dieser und dem Auftreten einer GvHD gefunden werden (Dickinson *et al.* 1994; Tanaka *et al.* 1995).

Es gibt Untersuchungen, bei denen sich ein Zusammenhang zwischen der Frequenz Empfänger-spezifischer zytotoxischer T-Zell-Vorläuferzellen im Transplantat, die hauptsächlich in Verbindung mit MHC Klasse I-Molekülen auftreten und mittels „Limiting dilution“ bestimmt wurden, und dem Auftreten einer GvHD nach einer HLA-teilidentischen Stammzelltransplantation zeigte (Barnardo *et al.* 1996; Breur-Vriesendorp *et al.* 1990; Breur-Vriesendorp *et al.* 1991; Kaminski *et al.* 1988; Kaminski *et al.* 1989; Keever-Taylor *et al.* 1997; Roosnek *et al.* 1993; Schwarzer *et al.* 1994; Speiser *et al.* 1996; Spencer *et al.* 1995b; Spencer *et al.* 1995a; van Dijk *et al.* 2000). Jedoch konnte dieses Ergebnis in anderen Untersuchungen nicht bestätigt werden (Dickinson *et al.* 1998; Fussell *et al.* 1994; Keever-Taylor *et al.* 1997; van der *et al.* 1998; van Dijk *et al.* 2000). Da diese Methode keine sichere Reproduzierbarkeit liefert und zudem sehr aufwändig ist, wird im klinischen Alltag darauf verzichtet.

2.7. Übertragung T-zelldepletierter CD34+ Stammzellen

Wie bereits erwähnt, lässt sich durch die Übertragung T-zelldepletierter CD34⁺-Transplantate die Rate transplantationsbedingter Komplikationen vermindern, jedoch ist man zur Erlangung einer ausreichenden biologische Kompetenz des Transplantates zu DLI gezwungen, die diese Komplikationen wieder erhöhen.

Man bewegt sich daher momentan in einem engen Bereich zwischen ausreichender biologischer Kompetenz des Transplantates und möglichst geringer empfängerspezifischer Toxizität. Im klinischen Alltag werden nach Stammzelltransplantation etwa $1,5 \times 10^4$ bis 6×10^7 T-Zellen pro kgKG transfundiert, um den Patienten einen ausreichenden Schutz vor Infektionen zu ermöglichen, ohne das Risiko einer GvHD all zu stark zu erhöhen (Depil *et al.* 2004; Handgretinger *et al.* 2003; Klingebiel *et al.* 2004; van der Straaten *et al.* 2001). Auch für das Anwachsen

des Transplantates spielt die Gabe von Spender-T-Zellen eine entscheidende Rolle. Es konnte zwar eine Verbesserung des Heilungserfolges mit einer geringeren Rate an Transplantatversagern nach Transplantation von sehr hohen Dosen von bis zu 1×10^7 Zellen/kgKG hochgereinigter CD34⁺-Stammzellen oder bei Verwendung monoklonaler antiadhäsiver Antikörper beobachtet werden, jedoch bietet diese Transplantationsmöglichkeit keinen Infektionsschutz und die Rate an Transplantatversagern könnte sich durch die Gabe von T-Zellen nach Transplantation noch weiter verringern lassen (Aversa *et al.* 1994; Barge *et al.* 2003; Cavazzana-Calvo *et al.* 1996; Handgretinger *et al.* 2003; Jabado *et al.* 1996; Klingebiel *et al.* 2004). Bei Stammzelltransplantationen bei Patienten mit malignen Erkrankungen des blutbildenden Systems ergibt sich des Weiteren das Problem, dass die unerwünschte GvHD in engem Zusammenhang mit der hier erwünschten GvL-Reaktion steht, die für die Verminderung der Rezidivhäufigkeit von entscheidender Bedeutung ist (Goldman *et al.* 1988; Horowitz *et al.* 1990; Marmont *et al.* 1991; Soiffer *et al.* 1992; Thomas *et al.* 1986; Weiden *et al.* 1979). Jedoch konnte gezeigt werden, dass zwischen GvHD und GvL zwar ein enger Zusammenhang besteht, sie aber nicht untrennbar miteinander verbunden sind (Barrett und Malkovska 1996; Falkenburg *et al.* 1999; Hessner *et al.* 1995; Horowitz *et al.* 1990; Kolb *et al.* 1995; Mackinnon *et al.* 1995; Truitt und Johnson 1995). Die Methode der Transplantation von T-zelldepletierten CD34⁺ Zellen wurde auch deswegen immer mehr genutzt, da weniger als ein Drittel derjenigen Patienten, für die eine Transplantation von Knochenmark oder Stammzellen als Therapieoption in Frage kam einen HLA-identischen verwandten Spender zur Verfügung hatte (Fischer *et al.* 1994; O'Reilly *et al.* 1989).

2.8. Möglichkeiten der T-Zell-Modifikation vor DLI

Zur Vermeidung der im Zusammenhang mit einer DLI auftretenden Komplikationen sind verschiedene Ansätze untersucht worden, die Spender T-Lymphozyten noch weiter zu modifizieren. So wurden zur Infektionsprophylaxe spezielle T-Zellen, die eine Reaktivität gegen Epstein-Barr-Virus (EBV) - oder Cytomegalie-Virus (CMV) - infizierte Zellen zeigten, gewonnen und vermehrt. Diese Zellen wurden dann nach Stammzelltransplantation gegeben, um die Erkrankungshäufigkeit an diesen

speziellen Erkrankungen zu senken ohne das GvHD-Risiko deutlich zu erhöhen (Reusser *et al.* 1997; Riddell *et al.* 1991; Riddell und Greenberg 1997; Rooney *et al.* 2001; Walter *et al.* 1995). Jedoch sind die Verfahren zur Gewinnung solcher Zellen sehr aufwendig und es konnten damit auch nur die speziellen Infektionen, gegen die sich diese T-Zellen richten bekämpft werden.

In anderen Untersuchungen wurden Spender T-Zellen z.B. mit CTLA4-Ig alleine oder in Kombination mit Cyclosporin A anerg gegenüber Empfängerzellen gemacht (Gribben *et al.* 1996), oder es wurden speziell alloreaktive T-Zellen durch Abtötung mit einem Immunotoxin oder durch Separation anhand bestimmter Aktivierungsmarker, wie CD25 (IL-2 Rezeptor α), CD69, CD71, CD147 und HLA-DR, aus der Zellsuspension entfernt, wobei diejenigen T-Zellen erhalten blieben, die andere Funktionen ausführten (Chen *et al.* 2002; Rettinger *et al.* 2004; van Dijk *et al.* 1999). Es konnte in vitro gezeigt werden, dass die allospezifische T-Zelldepletion mit einem Immunotoxin gegen eine bestimmte Kette von Interleukin-2 spezifisch und reproduzierbar ist und die Aktivität dieser Zellen gegen Leukämiezellen und Viren nicht beeinträchtigt (Amrolia *et al.* 2003; Cavazzana-Calvo *et al.* 1990; Kreitman *et al.* 1994; Mavroudis *et al.* 1996; Mavroudis *et al.* 1998; Montagna *et al.* 1999). Kürzlich konnte auch in ersten klinischen Studien gezeigt werden, dass es möglich ist, die Helferfunktion der T-Zellen zu erhalten und dennoch das GvHD-Risiko zu minimieren (Andre-Schmutz *et al.* 2002; Cavazzana-Calvo *et al.* 2001).

2.9. Zellseparation

Die Therapieoption mit einer Transplantation von T-zelldepletierten Stammzellen und anschließender DLI das GvHD-Risiko zu senken und gleichzeitig das Auftreten von Infektionen zu verringern konnte vor allem seit der Einführung kommerzieller Zellseparationssysteme genutzt werden. Durch das breite Angebot an Antikörpern, die heute zu Separationszwecken zur Verfügung stehen ist es möglich Stammzellen gezielt zu gewinnen und anzureichern oder bestimmte Zellpopulationen, durch Bindung des Antikörpers an einen Oberflächenmarker, aus dem Transplantat zu entfernen. So existieren z.B. monoklonale Antikörper gegen die Oberflächenantigene CD2, -3, -7 auf T-Zellen oder CD19, -20 auf B-Zellen. Wenn die Antikörper an die entsprechenden Zielzellen binden spricht man von Positivselektion, binden die

Antikörper an zu eliminierende unerwünschte Zellen, so spricht man von Negativselektion. Um Targetzellen abzutrennen ist es möglich, durch Bindung der Antikörper an paramagnetische Partikel diese dann über ein Magnetfeld zu separieren. Die Zellen, die das Antigen auf der Zelloberfläche exprimieren, binden die Ak-beladenen Beads und können so im Separationsfeld zurückgehalten werden. Als Separationsfeld werden z.B. Säulen genutzt, in denen die paramagnetischen Beads zurückgehalten werden. Die Positivfraktion kann dann nach Entfernen der Separationssäule aus dem Magnetfeld ausgewaschen werden. Wenn die Positivfraktion therapeutisch genutzt werden soll, müssen die verwendeten Beads körperverschlinglich sein, oder sie müssen vor Übertragung der Zellen enzymatisch von diesen abgetrennt werden.

3. Ziele der Arbeit

Durch die Gabe von T-Zelldepletierten Stammzellen konnte zwar das Risiko einer GvHD deutlich reduziert werden, jedoch ergaben sich neue Komplikationen durch eine vermehrte Infektanfälligkeit, Transplantatabstoßungen oder das Ausbleiben des GvL-Effektes bei malignen Erkrankungen des blutbildenden Systems. Aus diesem Grunde erfolgen DLI in bestimmten Abständen nach Transplantation, um die Immunkompetenz des Patienten rasch wieder herzustellen. Diese DLI bergen jedoch wiederum das Risiko der Entstehung einer GvHD.

Ein weiteres Problem bei Stammzelltransplantationen besteht darin, dass auch bei molekulargenetischer Bestimmung des HLA-Typs von Spender und Empfänger keine sichere Voraussage darüber getroffen werden kann, wie hoch die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer GvHD ist. Verschiedene biologische Testverfahren, wie die MLC oder die Bestimmung zytotoxischer T-Zell-Vorläuferzellen im Transplantat erbrachten bisher noch keine die HLA-Typisierung übertreffenden Ergebnisse

Daraus ergeben sich folgende Fragen deren Klärung Ziel dieser Arbeit war:

- Ist es möglich durch Abtrennung alloreaktiver Zellen die Komplikationen einer DLI zu verringern?
- Wenn ja, wann ist der geeignete Zeitpunkt für die Separation?
- Welcher Zellart gehören diese alloreaktiven Zellen an?
- Sind die verbleibenden T-Zellen noch immunkompetent?
- Gibt es eine Möglichkeit biologische Testmethoden zur Erkennung von HLA-Differenzen so zu modifizieren, dass sie die HLA-Typisierung noch ergänzen können?
- Ist die Abtrennung effektiv?
- Lassen sich diese Ergebnisse an Zellen bereits transplanterter Patienten und Ihrer Spender bestätigen?

Damit die Ergebnisse dieser Untersuchungen auch in die Praxis umgesetzt werden können, war es uns wichtig Methoden zu verwenden, die auch klinisch anwendbar sind.

4. Methodik

4.1. Material

Tab. 1: Stamm-Lösungen:

Produkt	Zusammensetzung	Hersteller
PBS, pH 7,3	in 1000 ml: 8g Natriumchlorid; 0,2g Kaliumchlorid; 0,25g Kaliumdihydrogenphosphat; 1,35g Dinatriumhydrogenphosphat;	Serag-Wiessner GmbH und Co.KG, Naila/Bayern
Ficoll-Paque		Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala Schweden
Glutamin	N-acetyl-L-alanyl-L-glutamin	Biochrom KG, Berlin
Streptomycin		Grünethal GmbH, Stolberg
Penicillin		Jenapharm GmbH, Jena
HSA		DRK-Blutspendedienst Niedersachsen, Springe
Fix-Denat		Boehringer, Mannheim
FKS	vorgetestete Charge	Biochrom KG, Berlin
EDTA		Apotheke des Klinikums der FSU Jena
PHA	Konzentration 40 µg/ml	Welcome Reagents Limited, Welcome Research Laboratories, Beckenham England
IL-2	Konzentration 50 ng/ml	Biotech, Hannover
SCF	Konzentration 500 ng/ml	Amgen Thousand Oaks
RPMI		SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DMSO		WAK-Chemie Medical GmbH
RPMI 1640		Seromed Biochrom KG, Berlin
Natriumhydroge nkarbonat		SERVA, Heidelberg
Anti-CD69-Ak		Phar Mingen Becton Dickinson, Franklin Lakes USA
Anti-CD8-AK		Immunotech Coulter Company, Marseille Frankreich
Anti-CD3-AK		Coulter Corporation, Miami USA
Isotype- Kontrolle		Dako

Fortsetzung Stamm-Lösungen

BrdU	Konzentration 100 µM	Boehringer, Mannheim
Anti-BrdU-POD	Konzentration 0,2 E/ml	Boehringer, Mannheim
TMB-Substrat	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim
CD69-Hapten-Ak		Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Anti-Hapten Micro-Beads-FITC		Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Thymidin	37 MBq/ml	Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala Schweden

Tab. 2: Geräte:

Gerät	Modell	Hersteller
Zentrifuge	Rotixa 120 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Zellzählgerät	Coulter AC.T diff	Coulter Corporation, Miami USA
Zellfixations- und	Epics Immunology Workstation, Q-Prep	Coulter Corporation, Miami USA
Durchflußzytom e-trie-Messgerät	Epics Profile II	Coulter Corporation, Miami USA
Betrachtungs-gerät	IBL 437 C	CIS-Bioindustries
Eismaschine		Ziegra Eis-Maschinen, Iernhagen
Brutschrank	IG 150	Jouan
Zentrifuge für 96-Loch-Platten	Rotanta/R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Spektralphotometer	Spectra III	SLT-Labinstruments, Crailsheim
Thymidin-Einbau-	Matrix 96 Direct Beta Counter	Canberra Packard, Frankfurt
Einfriergerät	TRA-14	Cryoson-GmbH, Schöllkrippen
Stickstoffbehälter	CHRONOS	Messer, Griesheim
Laminar air flow Werkbank		Uniflow
Kühlschrank	dkk 186	Foron
Zellerntegerät für den Thymidineinbau	MicroMate 196, Simultaneous 96-Well Harvester	Canberra Packard, Frankfurt
Zytospin-Zentrifuge	Cytospin 3	Shandon

Tab. 3: Einwegmaterialien:

Material	Modell	Hersteller
Zentrifugenröhrchen	Cellstar	Greiner bio-one Labortechnik
Pipetten		Socorex, Schweiz
Spritzen		B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kanülen		B. Braun Melsungen AG, Melsungen
pH-Messpapier		Merck, Darmstadt
Sterilfilter für die Sterilisation von RPMI	Media-Cap-5	Spectrum, Laguna Hills CA
Sterilfilter für die Sterilisation von Serum	Filtropur S Spritzenfilter	Sarstedt, Nümbrecht
96-Loch-Platte	96-Loch-Rundbodenplatte	Becton-Dickinson, Franklin Lakes USA
Säule	Mini Macs	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Cryotubes	Cellstar (Inhalt 1,8 ml)	Greiner bio-one Labortechnik
Serummonovetten	Serum Z / 9 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Heparinmonovetten	NH4-Heparin AH / 9 ml	Sarstedt, Nümbrecht

4.1.1. Spenderdaten

42 freiwillige nicht miteinander verwandte gesunde Spender im Alter zwischen 21 und 52 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 24 Jahren.

Bei dem PRB und dem Blut der dazugehörigen Mütter handelt es sich um freiwillige Spenden von Frauen, die in der Frauenklinik Jena entbunden worden sind. Das Alter der Frauen ist nicht bekannt.

Tab. 4: Patienten:

<u>Patienten</u>	<u>Anzahl insgesamt</u>	<u>Erkrankung / Anzahl</u>	<u>Durchschnittsalter des Empfängers</u>	<u>Durchschnittsalter des Spenders</u>
HLA- identisch	12	ALL / 6 AML / 2 CML / 2 MDS / 1 SAA / 1	11 Jahre	37 Jahre
HLA- teilidentisch	9	ALL / 5 AML / 2 NHL / 1 SAA / 1	12 Jahre	37 Jahre

4.2. Methoden

4.2.1. Herstellung des Normalserumpools

Das in Serummonovetten abgenommene Blut gesunder Spender wurde bei 2000 U/min. 15 Minuten lang zentrifugiert. Das Serum wurde abgehoben und gepoolt. Der Pool wurde dann erneut bei 4000 U/min. 15 Minuten lang zentrifugiert. Das überstehende Serum wurde abgehoben und über drei Filter steril filtriert. Anschließend wurde das Serum zur Inaktivierung eine Stunde lang bei 56°C in einem Wasserbad erhitzt.

4.2.2. Herstellung von RPMI-Medium

10,43 g pulverförmiges RPMI wurden in 400 ml und 2 g Natriumhydrogenkarbonat in einer kleinen Menge doppelt destilliertem Wasser aufgelöst. Anschließend wurden das Natriumhydrogenkarbonat und das RPMI gemischt und auf einen Liter aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mittels Indikatorpapier bestimmt und mit HCl auf einen Sollwert von pH 7,5 eingestellt. Diese Lösung wurde dann steril filtriert. Zur Herstellung des fertigen Mediums wurden 100 ml RPMI-Medium mit 15 ml Normalserum, 500 µl Glutamin, 240 µl Streptomycin und 120 µl Penicillin vermengt.

4.2.3. Herstellung mononukleärer Zellen (MNC)

Zur Herstellung der mononukleären Zellen wurde ausschließlich frisch gewonnenes heparinisiertes Blut, das in eine Heparinmonovette abgenommen wurde, verwendet. Es wurde im Verhältnis 1:3 mit PBS (Phosphate Buffered Saline) verdünnt. Anschließend wurden 15 ml Ficoll-Paque in ein Zentrifugenröhrchen vorgelegt und vorsichtig mit 35 ml PBS-Blutgemisch überschichtet. Zur Trennung der Zellen wurden die Zentrifugenröhrchen dann bei 400 g 30 Minuten lang zentrifugiert. Der Ring mit den mononukleären Zellen an der Ficoll-Grenzschicht wurde abpipettiert und in 5 ml vorgelegten Medium aufgenommen, mit Medium aufgefüllt und erneut bei 1850 U/min. 15 Minuten lang abzentrifugiert. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 5×10^6 bis 2×10^7 Zellen pro ml in Medium aufgenommen.

4.2.4. Kryokonservation und Auftauen kryokonservierter Zellen

Einfrieren mononukleärer Zellen

Die Zellen, die nicht sofort zu Versuchen verwendet wurden, wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dabei wurde die eine Hälfte aus praktischen Gründen bereits vor dem Einfrieren zur Inaktivierung mit 30 Gy bestrahlt. Die Zellsuspensionen wurden 1:1 mit Einfrierlösung aus PBS, DMSO (Dimethylsulfoxid) und HSA

(Humanserumalbumin) gemischt, in Einfrierröhrchen gegeben und im Einfrierautomaten programmiert auf -190°C abgekühlt. Die eingefrorenen Proben wurden in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert.

Auftauen mononukleärer Zellen

Die Zellen in den Einfrierröhrchen wurden zügig in 37°C warmem Wasser aufgetaut, in größere Röhrchen umpipettiert und dann auf Eis stehend tropfenweise mit PBS auf 12 ml aufgefüllt. Anschließend wurden sie gewaschen und mit einer Konzentration von 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen pro ml in Medium aufgenommen. Die Zellen wurden nun einen Tag lang in den Brutschrank (37°C und 5% CO_2) gestellt, um langsam zu regenerieren, bevor sie weiterverarbeitet wurden.

4.2.5. Ansetzen einer gemischten Lymphozyten-Kultur

Es wurden mononukleäre Zellen von gesunden Spendern verwendet. Die Hälfte der Zellen wurde mit 30 Gy bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden alle Zellen mit Medium auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml eingestellt.

Verstärkung der MLC-Reaktivität zur Erhöhung der Sensitivität

Zur Verstärkung der MLC-Sensitivität wurden nach Ansatz einer gemischten Lymphozyten-Kultur pro 10^5 Zellen 10 ng SCF (Stammzellfaktor) zugegeben. Am vierten Tag nach Ansatz wurden dann 0,5 ng IL-2 pro Loch zugegeben.

4.2.6. Durchflußzytometrie zur Bestimmung der CD-69-Expression

$1,5 \times 10^6$ unbestrahlte Zellen des Spenders A und $1,5 \times 10^6$ bestrahlte Zellen des Spenders B wurden gemischt und im Brutschrank für die jeweils benötigte Dauer von 1 bis 6 Tagen inkubiert. Um einen ausreichenden Kontakt der Zellen zu

gewährleisten und gleichzeitig ein Verklumpen zu verhindern, wurden 5 ml Rundbodenröhrchen verwendet.

Vom ersten bis zum sechsten Tag nach Ansatz der MLC wurden täglich aus jedem Röhrchen je 200000 Zellen für die Probe und 200000 Zellen für die Kontrolle entnommen. Das Medium wurde mit Protein-PBS ausgewaschen. Auf das Zellpellet der Probenröhrchen wurden je 10 µl Anti-CD69-Ak, 5 µl Anti-CD3-Ak und 2 µl Anti-CD2-Ak pipettiert. Auf den Bodensatz der Kontrollröhrchen wurden je 6 µl der unspezifischen Isotypen-Kontrolle pipettiert. Die Zellen wurden 20 Minuten mit den Antikörpern inkubiert und dann mit der Coulter Epics Immunology Workstation lysiert, fixiert und gewaschen. Anschließend erfolgte die Messung der Proben in der Durchflußzytometrie. Es wurden mindestens 200000 Events mit der Coulter Epics Profile Software analysiert.

4.2.7. BrdU-Einbautest zur Ermittlung der Zell-Proliferationsrate

Es wurden jeweils 50000 unbestrahlte Zellen von Spender A und 50000 bestrahlte Zellen von Spender B in einem 5-fach Ansatz auf eine 96-Loch-Rundbodenplatte pipettiert und im Brutschrank jeweils 2 bis 8 Tage inkubiert. Um eine Austrocknung zu vermeiden und überall gleiche Bedingungen herzustellen, wurden die äußeren Löcher der Platte mit Medium gefüllt. Als Eigenkontrolle wurde eine autologe Probe mitgeführt, anhand derer dann zur Normierung der Messwerte der Stimulationsindex (SI) berechnet wurde.

$$SI = \frac{\text{Einbaurate der Probe}}{\text{Einbaurate der autologen Probe}}$$

Es wurden jeweils am Tag 2 bis Tag 8 nach Ansatz der gemischten Lymphozyten-Kultur auf einer 96-Loch-Platte 10 µl Bromdesoxyuridin (BrdU) pro 100 µl Zellsuspension zugegeben. Die Zellsuspensionen wurden dann weitere 18 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die 96-Loch-Platte dreimal mit PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurde die Platte 24 Stunden lang bei Raumtemperatur zum Trocknen aufgestellt. Es wurden 50 µl Fix-Denat in jedes Loch der Platte gegeben und diese 30 Minuten inkubiert. Die Platte wurden dann erneut dreimal mit PBS gewaschen, und es wurden pro Loch 20 µl Anti-BrdU-POD-Ak

zugegeben, woraufhin die Platte zwei Stunden lang inkubiert wurde. Die Zellen in der Platte wurden wiederum dreimal mit PBS gewaschen. und es wurden 100 µl Tetramethylbenzidin (TMB) -Substrat in jedes Loch gegeben und die Platte erneut 30 Minuten zum Inkubieren stehengelassen. Die Reaktion wurde mit 50 µl 1%-iger H₂SO₄ pro Loch abgestoppt. Anschließend erfolgte die photometrische Auswertung im Plattenreader bei einer Wellenlänge von 450 nm.

4.2.8. Thymidin-Einbau-Assay zur Messung der Zellproliferation nach Aktivierung durch fremde mononukleäre Zellen vor und nach der Zellseparation

Es wurden jeweils 50000 unbestrahlte Zellen von Spender A und 50000 bestrahlte Zellen von Spender B in einem 5-fach Ansatz auf eine 96-Loch-Rundbodenplatte pipettiert und im Brutschrank 7 Tage inkubiert. Um eine Austrocknung zu vermeiden und überall gleiche Bedingungen herzustellen, wurden die äußeren Löcher der Platte mit Medium gefüllt. Als Eigenkontrolle wurde eine autologe Probe mitgeführt, anhand derer dann zur Normierung der Messwerte der Stimulationsindex (SI) berechnet wurde.

$$SI = \frac{\text{Einbaureate der Probe}}{\text{Einbaureate der autologen Probe}}.$$

Es wurde jeweils vor und nach der Zellseparation eine gemischte Lymphozyten-Kultur in oben beschriebener Weise angesetzt. Am siebten Tag nach Ansetzen der gemischten Lymphozyten-Kultur wurden pro Loch der Titerplatte 37 kBq H³-Thymidin zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden erfolgte die Ernte und Messung der Platten.

4.2.9. Zellseparation zur Abtrennung aktivierter Zellen

$1,5 \times 10^6$ unbestrahlte Zellen des Spenders A und $1,5 \times 10^6$ bestrahlte Zellen des Spenders B wurden gemischt und im Brutschrank für 4 Tage inkubiert. Um einen

ausreichenden Kontakt der Zellen zu gewährleisten und gleichzeitig ein Verklumpen zu verhindern, wurden 5 ml Rundbodenröhrchen verwendet.

Zur Zellseparation wurden mit paramagnetischen Beads beladene Ak verwendet, die an den Aktivierungsmarker CD69 binden, und somit eine Abtrennung derjenigen Zellen, die diesen Marker tragen, im Magnetfeld ermöglichen. Die Vorbereitung der Zellen für die Separation erfolgte wie in Abb. 1 dargestellt.

Anschließend wurden die Säulen (Abb. 2) für die Separation vorbereitet. Dazu wurde die Säule mit 500 µl Puffer gewaschen und diese Fraktion verworfen. Nun wurden die 500 µl Zellsuspension auf die Säule gegeben und nach Durchlauf mit 3 x 500 µl Puffer gespült. Diese gesamte Fraktion (Negativ-Fraktion) wurde in einem Röhrchen gesammelt. Die Säule wurde nun aus dem Magnetfeld entfernt und erneut mit 1 ml Puffer gespült. Aus der Negativ-Fraktion wurde eine gemischte Lymphozyten-Kultur in der gleichen Spender-Empfänger Paarung wie vor Separation angesetzt.

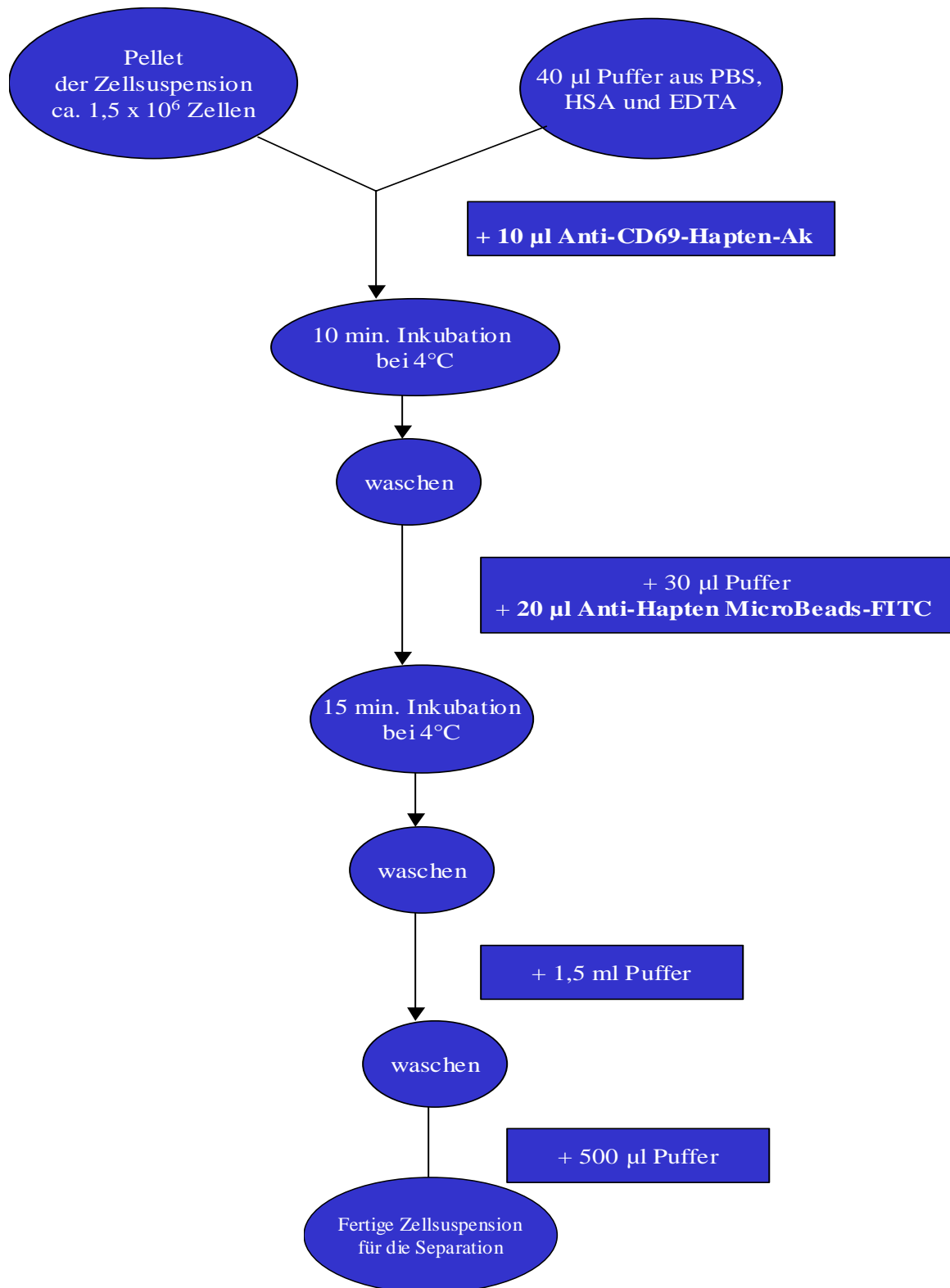


Abb. 1:

Vorgehensweise bei der Vorbereitung der Zellen für die magnetische Zellseparation.

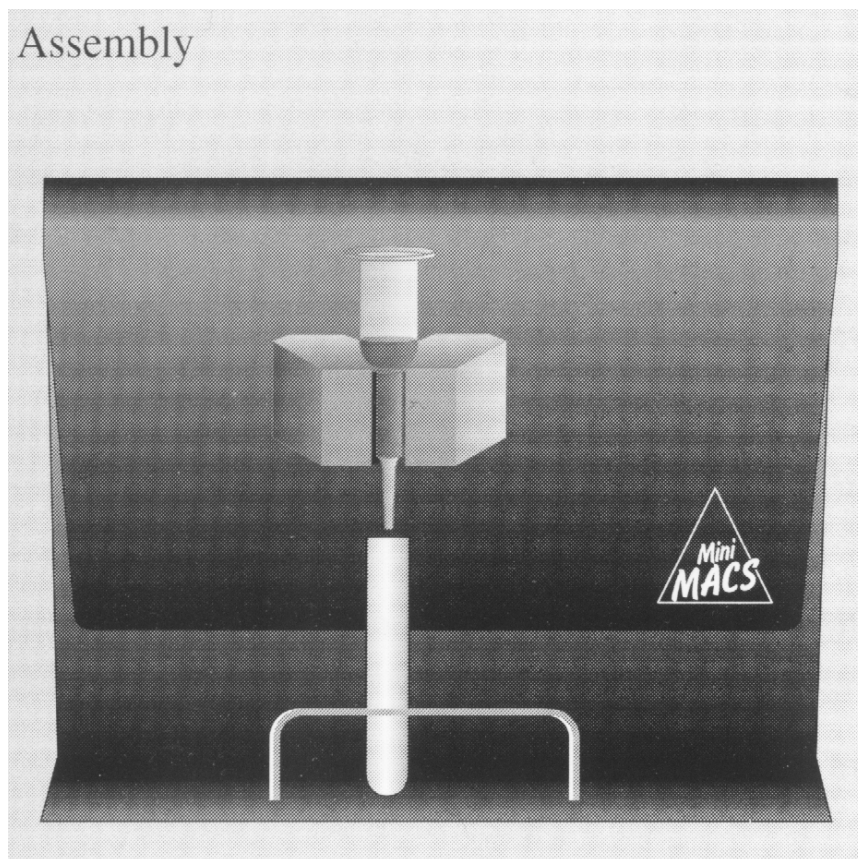


Abb.2:
Schematischer Aufbau der Separationssäule.

4.2.10. Lymphozytentransformationstest zur Bestimmung des Funktionsniveaus der Zellen

Es wurden jeweils vor und nach der Zellseparation Spenderlymphozyten auf eine Titerplatte pipettiert. Dann wurden 25 μ l Phytohämagglutinin (PHA) bzw. 25 μ l Medium pro Loch zugegeben. Die Platten wurden anschließend zum Wachsen in den Brutschrank gestellt. Am dritten Tag nach Ansetzen des Lymphozytentransformationstests (LTT) wurden pro Loch der Titerplatte 37 kBq H3-Thymidin zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden erfolgte die Ernte und Messung der Platten.

4.2.11. Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit dem Programm SPSS (Version 12) vorgenommen. Es erfolgte bei allen Ergebnissen stets der Vergleich von Mittelwerten. Dabei wurde zunächst ein Test auf Normalverteilung der zu vergleichenden Proben mit dem Shapiro-Wilk-Index vorgenommen. Bei normalverteilten Proben wurde zur Bestimmung der statistischen Signifikanz ein 2-seitiger T-Test für gepaarte Stichproben mit einem 95% Konfidenzintervall angewendet. Bei einem P-Wert kleiner 0,05 wurde von einem statistisch signifikanten Unterschied der zu vergleichenden Mittelwerte ausgegangen. Bei nicht normalverteilten Proben wurde die 2-seitige asymptotische Signifikanz mit dem Wilcoxon-Test bestimmt. Auch hier wurde bei einem P-Wert kleiner 0,05 von einem statistisch signifikanten Unterschied der zu vergleichenden Mittelwerte ausgegangen.

5. Ergebnisse

5.1. Ermittlung des optimalen Separationszeitpunktes

In einem ersten Schritt wurden Untersuchungen angestellt, die dazu dienten, den optimalen Zeitpunkt für die Separation zu bestimmen und herauszufinden welchem Anteil der mononukleären Zellen diese ersten aktivierten Zellen angehören. Die Separation sollte zu dem Zeitpunkt erfolgen, an dem eine maximale Anzahl an Zellen durch HLA-Unverträglichkeit bereits aktiviert ist, jedoch noch keine Proliferation stattgefunden hat.

Zu diesem Zweck wurden MNC 12 gesunder Spender in einer MLC miteinander inkubiert und zunächst mittels Durchflußzytometrie an verschiedenen Tagen auf Ihren Anteil aktivierter Zellen untersucht. Als Marker für die Aktivierung wurde das Oberflächenantigen CD69 verwendet. Gleichzeitig wurden die Zellen daraufhin untersucht, ob sie zusätzlich noch CD3 trugen. Die CD3-positiven Zellen wurden noch nach CD4 oder CD8 aufgetrennt. Die Proliferationsraten nach HLA-Antigenstimulation wurden mittels eines BrdU-Einbautestes an frischen MNC von 6 und kryokonservierten MNC 8 gesunder Spender untersucht und miteinander verglichen.

5.1.1. Die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 nach HLA-Antigenstimulation

Die Anzahl aller CD69-positiven Zellen stieg zwischen dem vierten und dem fünften Tag nach Ansetzen der MLC deutlich an. Dabei zeigte sich auch, dass der Anteil der CD3-negativen gegenüber den CD3-positiven Zellen deutlich erhöht war. Bei den CD69CD4-positiven Zellen lagen die Unterschiede der CD69-Expression so eng beieinander, dass sie noch innerhalb der Fehlergrenze lagen und daher im beobachteten Zeitrahmen von keiner Veränderung des Anteils der CD69CD4-positiven Zellen auszugehen ist. Bei allen Zellen, die CD69 und CD8 trugen, konnte zwischen dem dritten und dem vierten Tag ein Anstieg und nach dem fünften Tag

dann wieder ein Abfall festgestellt werden. Diejenigen Zellen, die CD69CD3-negativ waren machten absolut den größten Teil aller aktivierten Zellen aus (Abb.3 und Abb.4). Im Mittel lag die maximalen CD69-Expression am 5. Tag.

Diese Untersuchungen wurden nur mit frischen und nicht auch noch zusätzlich mit kryokonservierten Zellen unternommen.

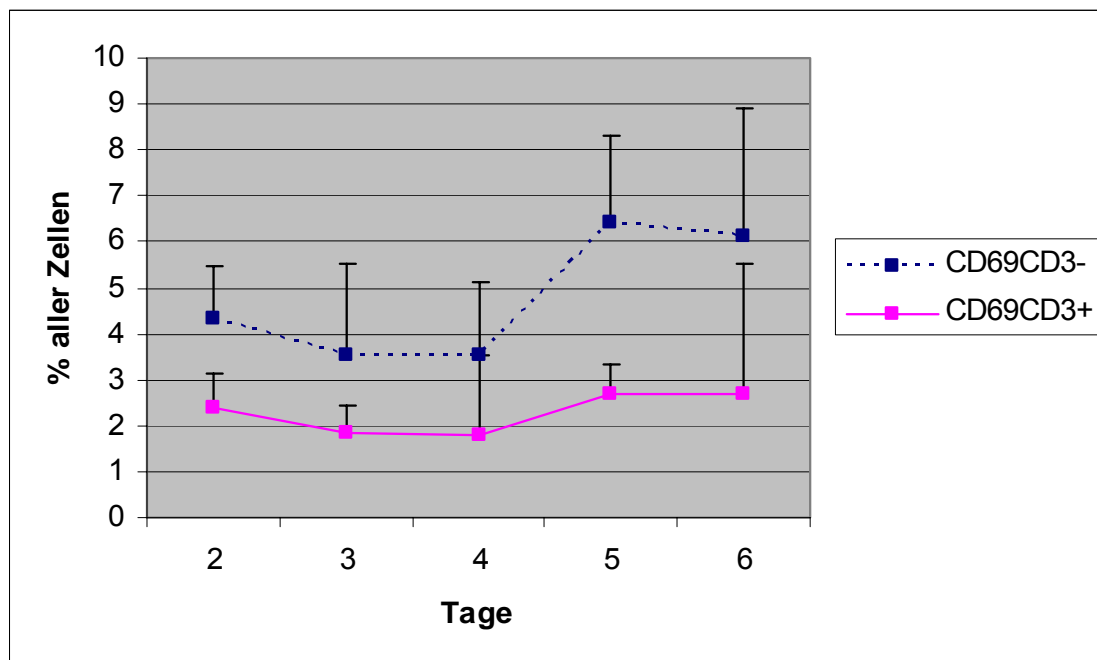


Abb.3:

Anteil der CD69-positiven Zellen an der Gesamtpopulation nach Stimulation mit inaktivierten MNC HLA-fremder Spender. Vergleich der CD3-positiven und CD3-negativen Zellen (n=12).

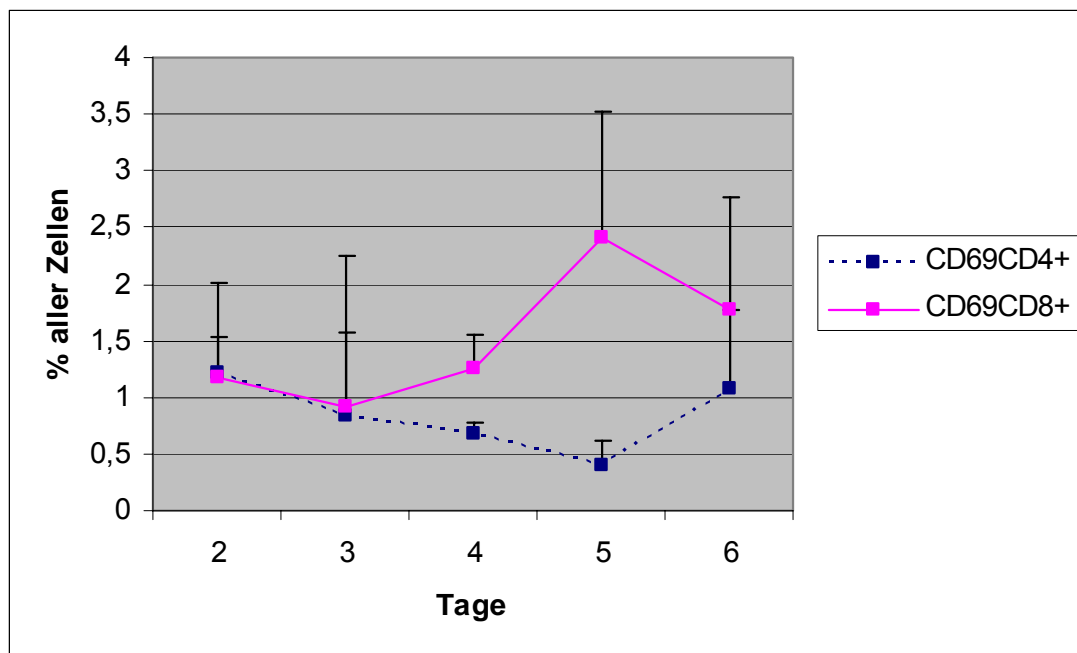


Abb.4:

Anteil der CD69-positiven Zellen T-Zellen an der Gesamtpopulation nach Stimulation mit inaktivierten MNC HLA-fremder Spender. Vergleich der CD4-positiven und CD8-positiven Zellen (n=12).

5.1.2. Die Proliferationsinduktion nach HLA-Antigenstimulation

Bei den frisch abgenommenen Zellen zeigte sich ein deutlicher Sprung in der Zunahme der Zell-Proliferationsrate ab dem fünften Tag nach Ansetzen der MLC (Abb.5). Der Unterschied in der Zell-Proliferationsrate zwischen dem vierten und dem fünften Tag ist statistisch signifikant ($p = 0,009$). Die gleiche Untersuchung wurde auch mit Zellen durchgeführt, die mit MNC angesetzt wurden, welche in flüssigem Stickstoff eingefroren waren. Bei diesen Zellen zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg der Zell-Proliferationsrate, der nach dem siebten Tag nach Ansetzen der MLC wieder abfiel. Ein eindeutiger Sprung in der Zell-Proliferationsrate war bei diesen Zellen nicht nachweisbar (Abb.5).

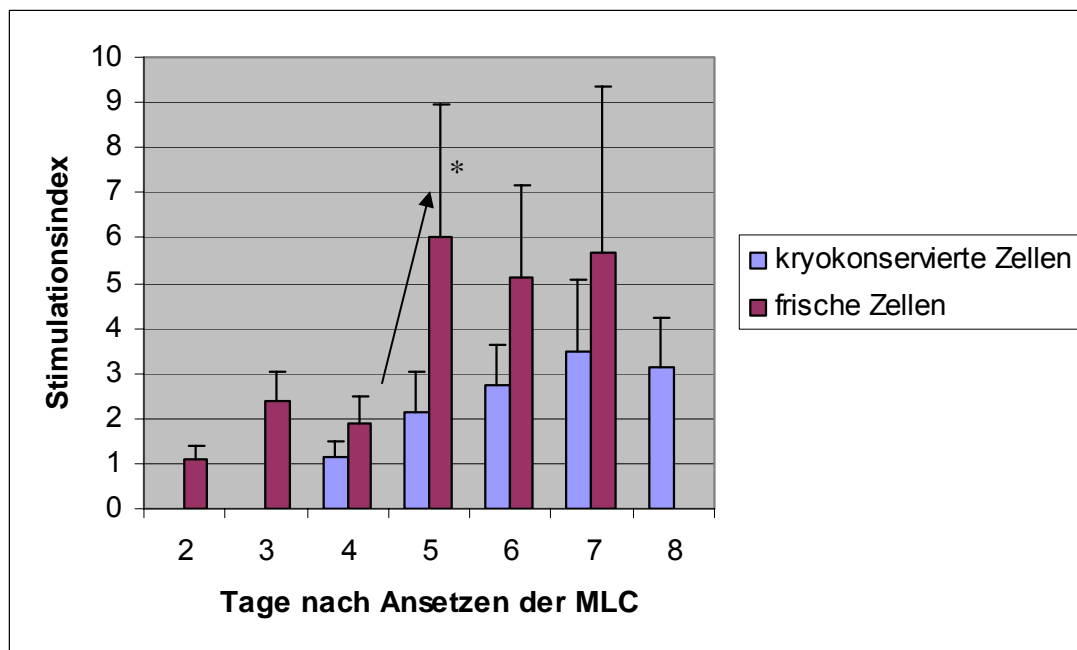


Abb.5:

Vergleich des Proliferationsverhaltens von frischen und kryokonservierten Zellen nach Alloantigenaktivierung in einer MLC gemessen mit dem BrdU-Einbau-Assay (n=8; p=0,009).

5.2. Untersuchungen zur Möglichkeit einer Verstärkung der MLC-Antwort

Bei diesen Untersuchungen sollte überprüft werden, ob durch Zugabe von IL-2 und SCF die MLC-Antwort verstärkt werden und damit eine verbesserte Aussage über HLA-Unverträglichkeiten getroffen werden kann. Eine Zugabe von SCF und IL-2 bei den verstärkten MLCs führte zu einer statistisch signifikanten Steigerung der Proliferationsrate gegenüber der regulären MLC und somit der Antwort auf HLA-Antigene fremder Zellen ($p = 0,002$) (Abb.6).

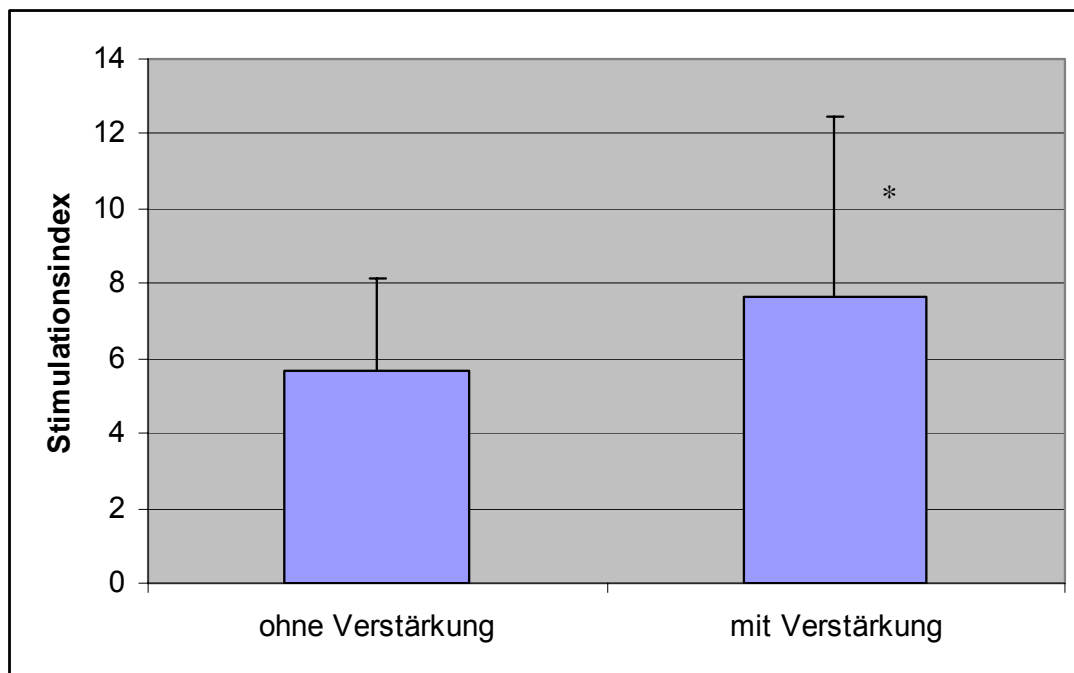


Abb.6:

Proliferationsverhalten in der MLC mit und ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren nach Alloantigenaktivierung mit HLA-inkompatiblen Zellen (n=12; p=0,002).

5.3. Untersuchungen zur HLA-Reaktivität und zur Zellfunktion vor und nach Separation

Mit Hilfe von antikörperbeschichteten Beads gegen den Aktivierungsmarker CD69 wurden am vierten Tag die HLA-reaktiven Zellen abgetrennt. Diese Zellen wurden vor und nach der Separation mittels Durchflußzytometrie zur Überprüfung der Effektivität der Separation daraufhin untersucht, ob der Anteil CD69-positiven aktivierten Zellen gesunken war und es wurde eine MLC vor und nach Separation angesetzt, um das Proliferationsverhalten zu bestimmen. Zudem wurde nach Separation noch eine verstärkte MLC angesetzt, um zu überprüfen, ob zu diesem Zeitpunkt die MLC-Antwort noch zu erhöhen ist. Zusätzlich wurden die Zellen auf Ihre Reaktivität gegen HLA-Antigene fremder Zellen, mit denen sie nicht vor Separation inkubiert worden waren, und auf Ihre Reaktivität gegen PHA als Mitogen untersucht.

5.3.1. Untersuchungen zur Zellfunktion vor und nach Separation

Um auszuschließen, dass der Rückgang der MLC-Reaktivität nach Separation nur durch den Zeitraum von 4 Tagen bedingt war, der bis zur Separation und dem Ansetzen der MLC, verging, wurde das Proliferationsverhalten von Zellen von 6 Spendern, deren MNC sofort nach Abnahme, bzw. 4 Tage nach der Blutentnahme und Inkubation im Brutschrank, angesetzt wurden miteinander verglichen.

In diesen Untersuchungen zeigte sich, dass die Reaktivität in der MLC bei einem Ansatz nach 4 Tagen sogar noch statistisch signifikant erhöht war ($p = 0,011$), wenn keine Zellseparation erfolgte (Abb.7).

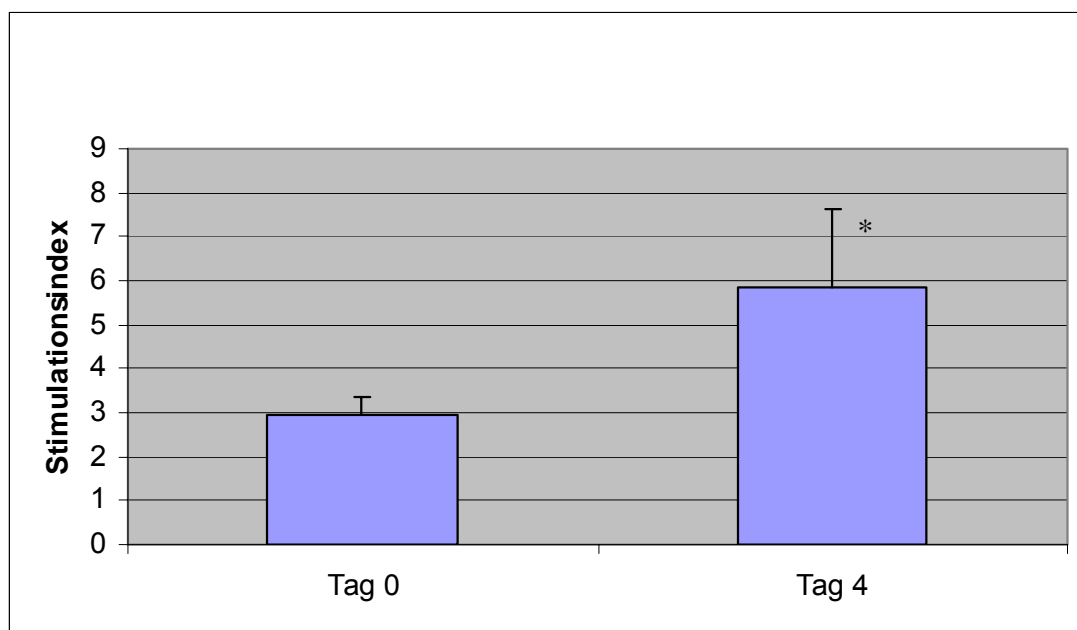


Abb.7:

Vergleich des Proliferationsverhaltens nach Alloantigenaktivierung bei Ansatz der MLC am Tag der Gewinnung der Zellen und bei Ansatz der MLC nach viertägiger Vorinkubation der Zellen in Medium ($n=6$; $p=0,011$).

Zur Testung der Reaktivität der Zellen auf ein Mitogen als Modell für die Zellreaktivität auf Erreger oder maligne Zellen wurde ein LTT mit MNC von 24 Spendern angesetzt, bei dem sich vor und nach Separation kein statistisch signifikanter Unterschied ergab ($p = 0,083$) (Abb.8).

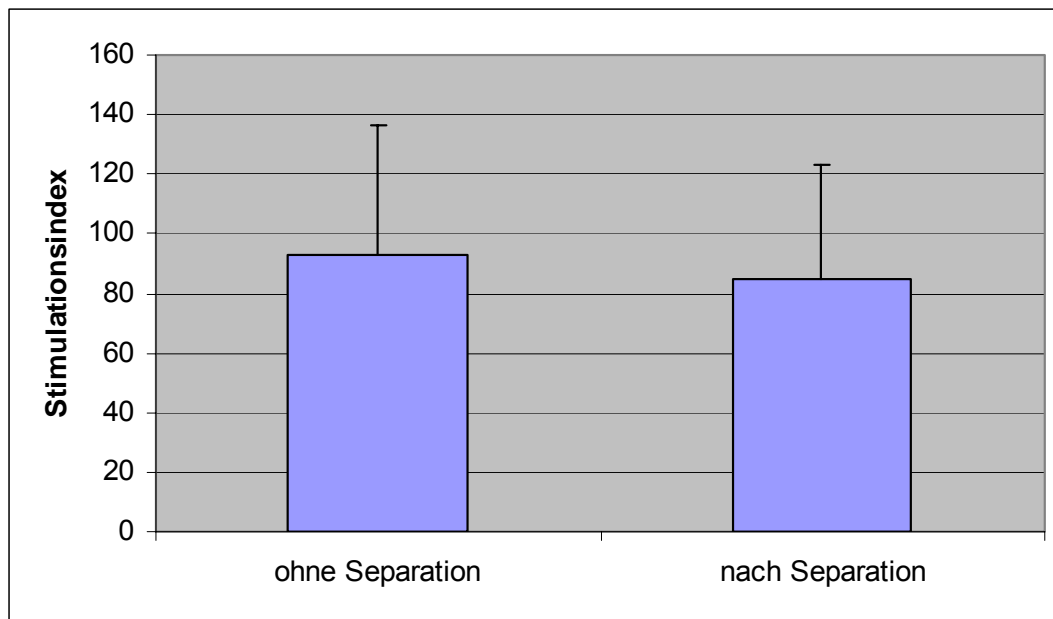


Abb.8:

Untersuchung der Reaktivität gegen Mitogene mittels LTT vor und nach Separation CD69-positiver Zellen (n=24; p=0,083).

5.3.2. Bestimmung der HLA-Reaktivität und der Anzahl der HLA-aktivierten Zellen vor und nach Separation

Ergebnisse der MLC

Es wurden mit MNC von 42 Spendern Untersuchungen durchgeführt. Mittels Zellseparation wurden die HLA-reaktiven Zellen am vierten Tag nach Ansetzen der MLC abgetrennt. Nach der Separation erfolgte eine erneute HLA-Stimulation mit Zellen des gleichen Spenders. Dabei zeigte sich, dass die HLA-Reaktivität gegen diese Zellen, die mittels Thymidin-Einbau-Assay ermittelt wurde, nach Separation statistisch signifikant verringert war ($p = 0,0001$) (Abb.9).

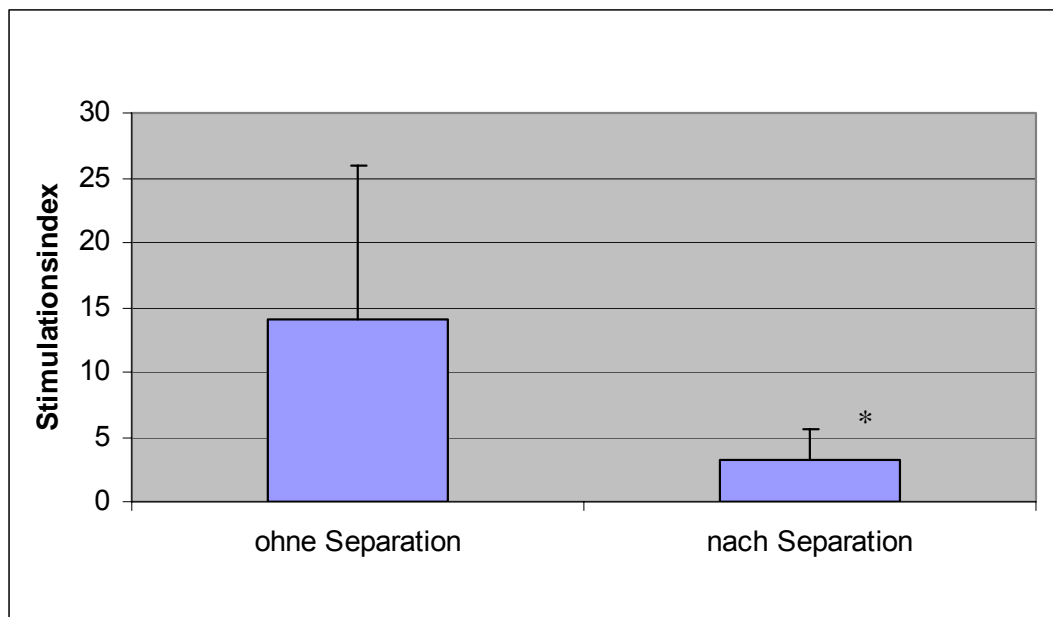


Abb.9:

Proliferationsverhalten in der MLC nach Alloantigenaktivierung ohne Separation und nach Abtrennung der CD69-positiven Zellen am Tag 4 und Restimulation mit Zellen des gleichen Spenders (n=42; p=0,0001).

Ergebnisse der Durchflußzytometrie

In der Durchflußzytometrie zeigte sich bei einem Ansatz mit MNC von 36 Spendern, dass die Anzahl HLA-aktivierter Zellen nach Separation und erneuter Induktion mit dem gleichen Spender deutlich reduziert war. Bei den Zellen, die CD69-positiv und CD3-negativ waren, ging der Anteil der aktivierten Zellen statistisch signifikant von 6,1% auf 0,5% zurück ($p = 0,0001$). Der Gesamtanteil der aktivierten Zellen fiel von 9% auf 2,8%, was einen statistisch signifikanten Unterschied darstellte ($p = 0,001$). Allerdings blieb der Anteil der Zellen, die CD69-positiv und CD3-positiv waren mit 2,6% und 2,3% vor und nach Separation in etwa gleich und es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,478$) (Abb. 10).

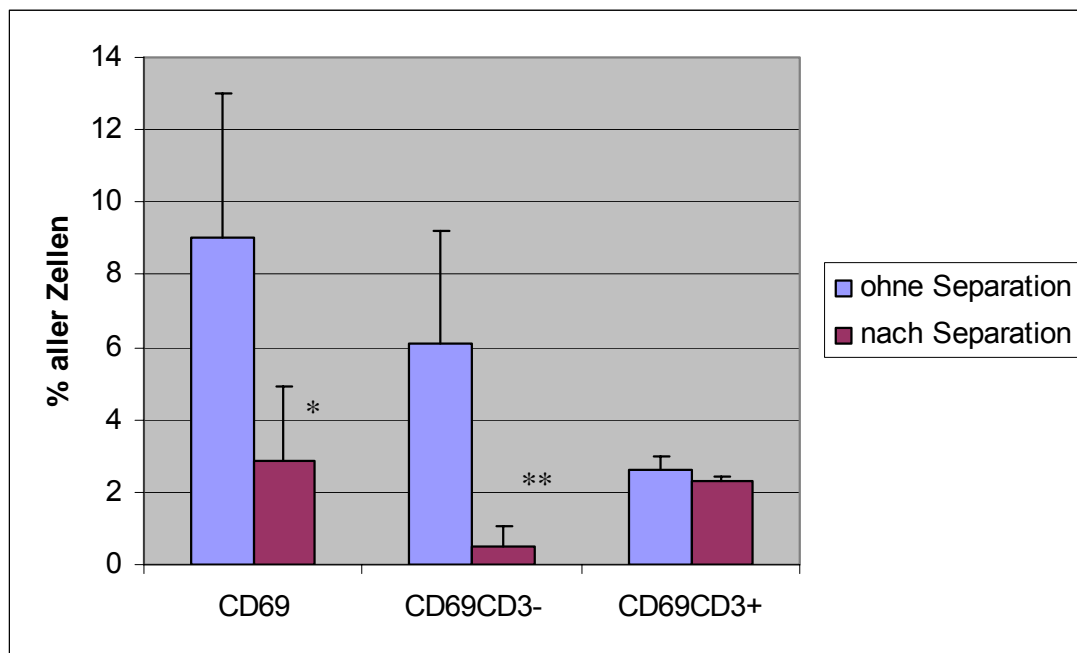


Abb.10:

CD69-Expression nach Alloantigenaktivierung ohne Separation und nach Abtrennung der CD69-positiven Zellen: gemessen jeweils am 4. Tag nach Ansetzen der MLC (n=36; p=0,478; *p=0,001; **p=0,0001).

5.3.3. Untersuchungen zur HLA-Bindung der Zellseparation

Anliegen dieser Versuche war es zu untersuchen, ob die Wirksamkeit der Separation davon abhängt, ob die Aktivierung HLA-reaktiver Zellen vor Separation mit den Zellen des Empfängers oder mit fremden Zellen vorgenommen wurde. Das heißt, es sollte untersucht werden, ob es bestimmte Zellen gibt, die für die HLA-Reaktivität zuständig sind und immer aktiviert werden, wenn eine HLA-Unverträglichkeit vorliegt, oder ob es für jeden HLA-Typ eigene Zellen gibt, die nur dann aktiviert werden, wenn eine Kontakt mit diesem speziellen HLA-Typ vorliegt. Im ersten Fall dürfte es bei einer Restimulation mit denjenigen Zellen, die zur Aktivierung vor Separation verwendet wurden, und bei einer Restimulation mit Zellen anderer HLA-Typen keinen Unterschied geben.

Bei einer Untersuchung mit MNC von 6 Spendern zeigte sich ein statistisch nicht signifikanter Anstieg der Reaktivität derjenigen Zellen, die mit dem gleichen Spender restimuliert wurden, gegenüber denjenigen Zellen, die nicht restimuliert wurden (p =

0,064) und ein ebenfalls statistisch nicht signifikanter Anstieg in der Reaktivität derjenigen Zellen, die mit einem anderen Spender restimuliert wurden, gegenüber denjenigen Zellen, die mit dem gleichen Spender restimuliert wurden ($p = 0,081$)(Abb.11).

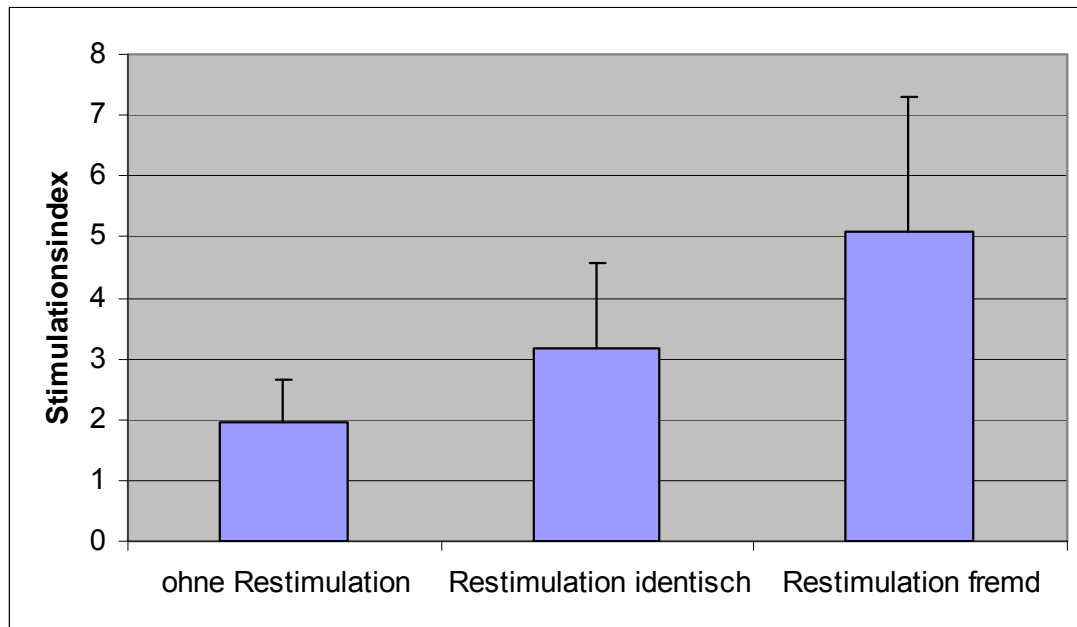


Abb.11:

Proliferationsverhalten nach Abtrennung der CD69-positiven Zellen: ohne Restimulation und bei Restimulation mit Zellen des gleichen Spenders und fremden Spenderzellen ($n=6$; $p=0,064$ bzw. $p=0,081$).

5.3.4. Untersuchungen zur MLC-Verstärkung nach Separation

Mit MNC von 12 Spendern wurden nach Separation jeweils MLCs mit und ohne Verstärkung angesetzt und deren Ergebnisse daraufhin untersucht, ob durch Zugabe von Wachstumsfaktoren die Rest-MLC-Antwort verstärkt werden kann. Diese Untersuchungen zeigen, dass auch nach Separation noch eine statistisch signifikante Erhöhung der MLC-Antwort durch eine Zugabe von IL-2 und SCF zu erzielen ist ($p = 0,003$) (Abb.12).

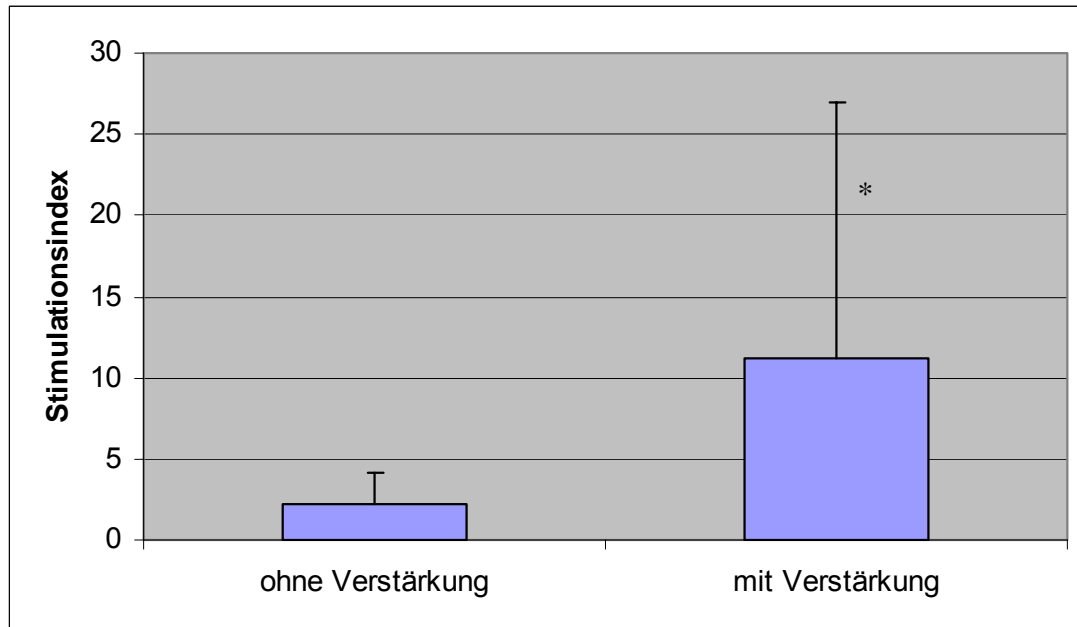


Abb.12:

Proliferationsverhalten nach Abtrennung der CD69-positiven Zellen und Restimulation mit Zellen des gleichen Spenders mit und ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren (n=12; p=0,003).

5.4. Modell für haploidentische Spender/Empfänger Paarungen

5.4.1. CD69-Expression nach HLA-Antigenstimulation mit teilidentischen Zellen

Als Modell für haploidentische Spender/Empfänger Paarungen verwendeten wir PRB und MNC der dazugehörigen Mütter. Wir führten zunächst Messungen der CD69-Expression an diesen Zellen am Tag 1 bis 6 nach Alloantigenaktivierung durch. Es erfolgte eine Aktivierung mit haploidentischen und HLA-inkompatiblen Zellen.

Bei den mütterlichen zeigte sich gegenüber fremden Zellen ein allmählicher Anstieg aller CD69-positiven Zellen ab dem 4. Tag, wobei das Maximum der CD69-Expression nicht innerhalb unseres Messzeitraumes lag. Bei mütterlichen MNC, die mit PRB des Kindes aktiviert wurden, zeigte sich bei den CD69-positiven und CD3-

negativen Zellen ein Maximum der CD69-Expression am Tag 5. Die CD69-positiven und CD3-positiven Zellen zeigten einen kontinuierlichen Anstieg vom Tag 4 bis zum Tag 6 (Abb.13 bis 16).

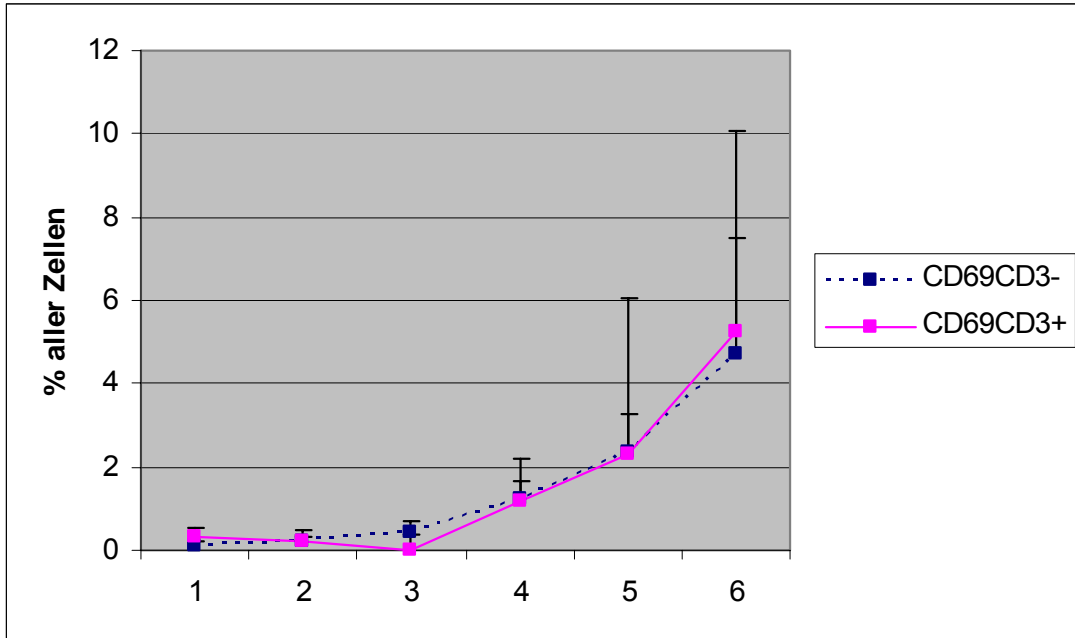


Abb.13:

Anteil der CD69-positiven mütterlichen Zellen nach Stimulation mit inaktivierten MNC HLA-fremder Spender. Vergleich der CD3-positiven und CD3-negativen Zellen (n=6).

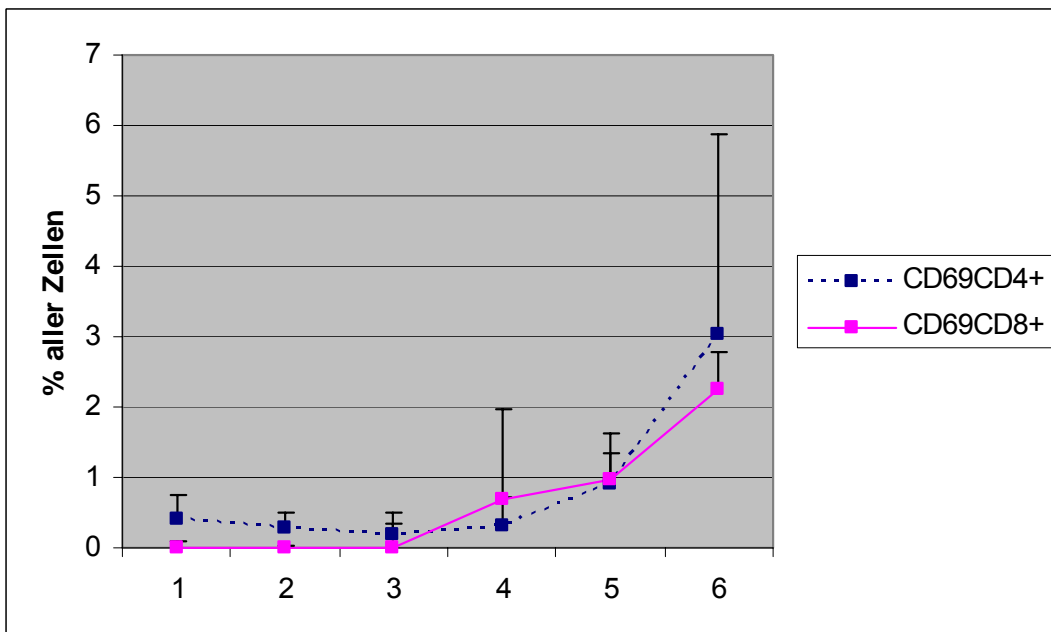


Abb. 14:

Anteil der CD69-positiven mütterlichen T-Zellen nach Stimulation mit inaktivierten MNC HLA-fremder Spender. Vergleich der CD4-positiven und CD8-positiven Zellen (n=6).

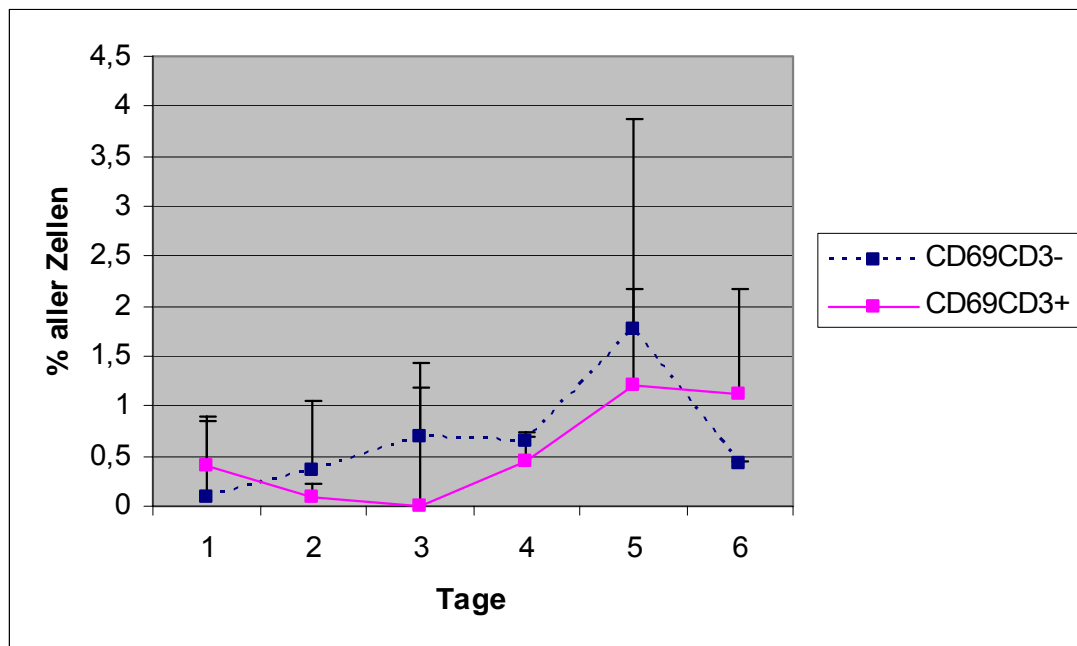


Abb.15:

Anteil der CD69-positiven mütterlichen Zellen nach Stimulation mit inaktiviertem PRB. Vergleich der CD3-positiven und CD3-negativen Zellen (n=4).

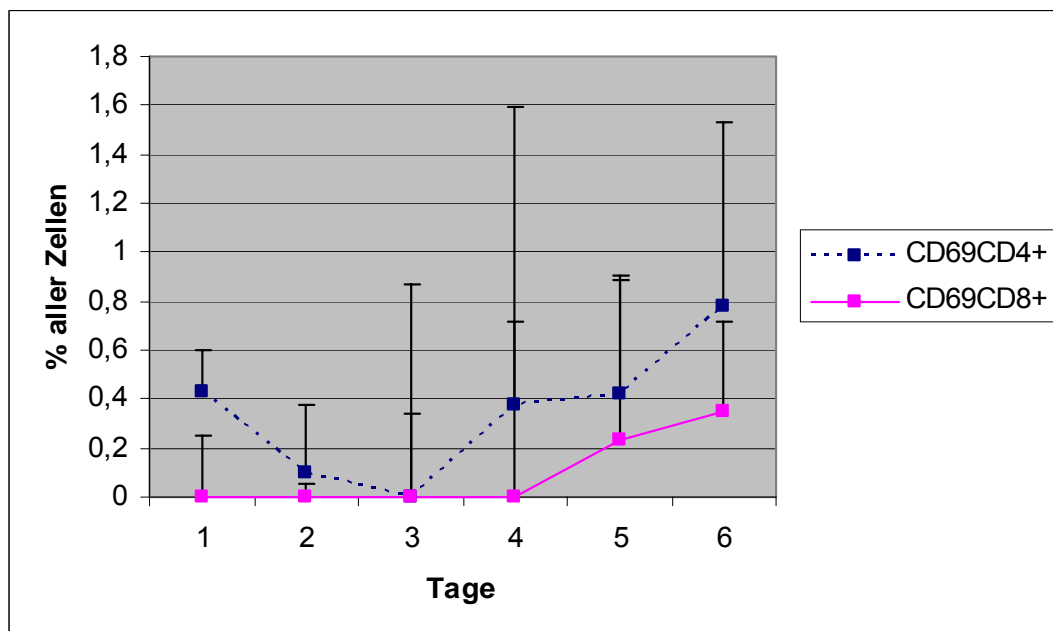


Abb. 16:

Anteil der CD69-positiven mütterlichen T-Zellen nach Stimulation mit inaktiviertem PRB. Vergleich der CD4-positiven und CD8-positiven Zellen (n=4).

Bei den PRB-Zellen zeigte sich bei denjenigen Zellen, die mit fremden MNC aktiviert wurden, ein Anstieg der CD69-positiven und CD3-negativen Zellen ab dem 2. Tag bis zum 6. Tag. Das Maximum lag außerhalb unseres Messzeitraumes. Bei den CD69-positiven und CD3-positiven Zellen zeigte sich während des gesamten Messzeitraumes kein eindeutiger Anstieg der CD69-Expression. Bei denjenigen Zellen, die mit mütterlichen MNC aktiviert wurden, zeigten sich bei den CD69-positiven und CD3-negativen Zellen ab Beginn der Messung hohe CD69-Expressionswerte mit einem allmähliche Abfall bis zum Tag 6. Die CD69-positiven und CD3-positiven Zellen stiegen am 3. Tag an, um dann bis zum Tag 6 wieder abzufallen. Hierbei handelt es sich fast ausschließlich um CD8-positive Zellen (Abb.17 bis 20).

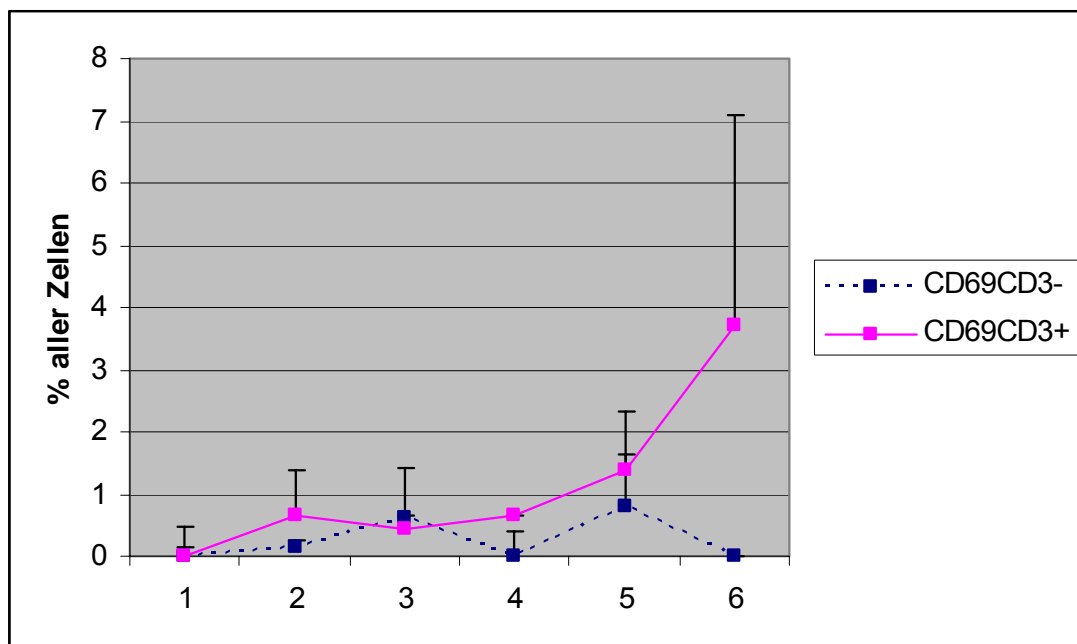


Abb.17:

Anteil der CD69-positiven PRB-Zellen nach Stimulation mit inaktivierten MNC fremder Spender. Vergleich der CD3-positiven und CD3-negativen Zellen (n=4).

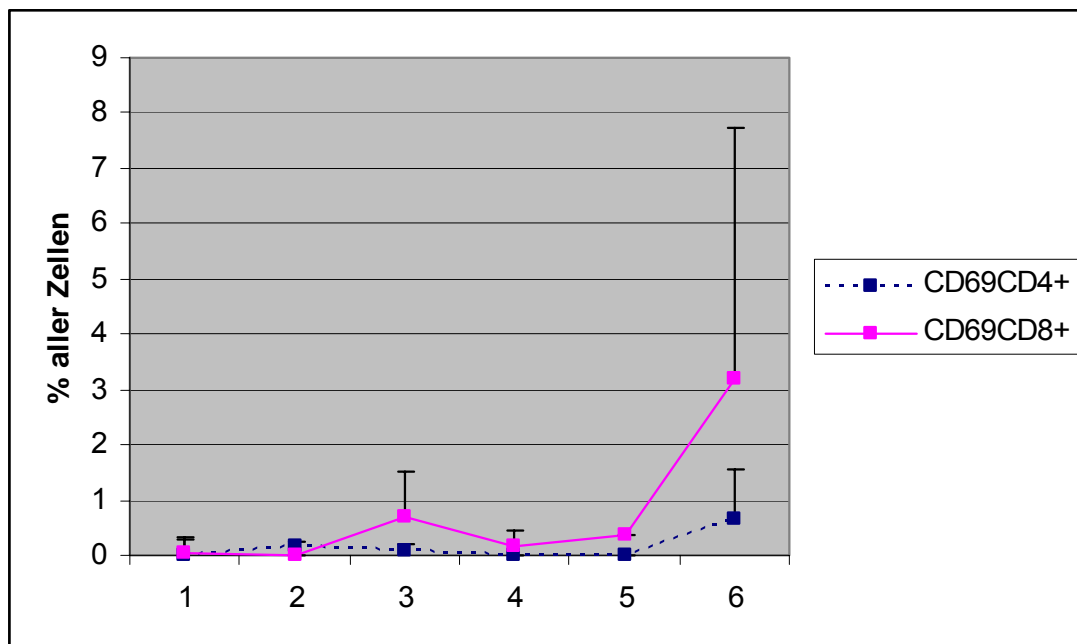


Abb. 18:

Anteil der CD69-positiven T-Zellen im PRB nach Stimulation mit inaktivierten MNC fremder Spender. Vergleich der CD4-positiven und CD8-positiven Zellen (n=4).

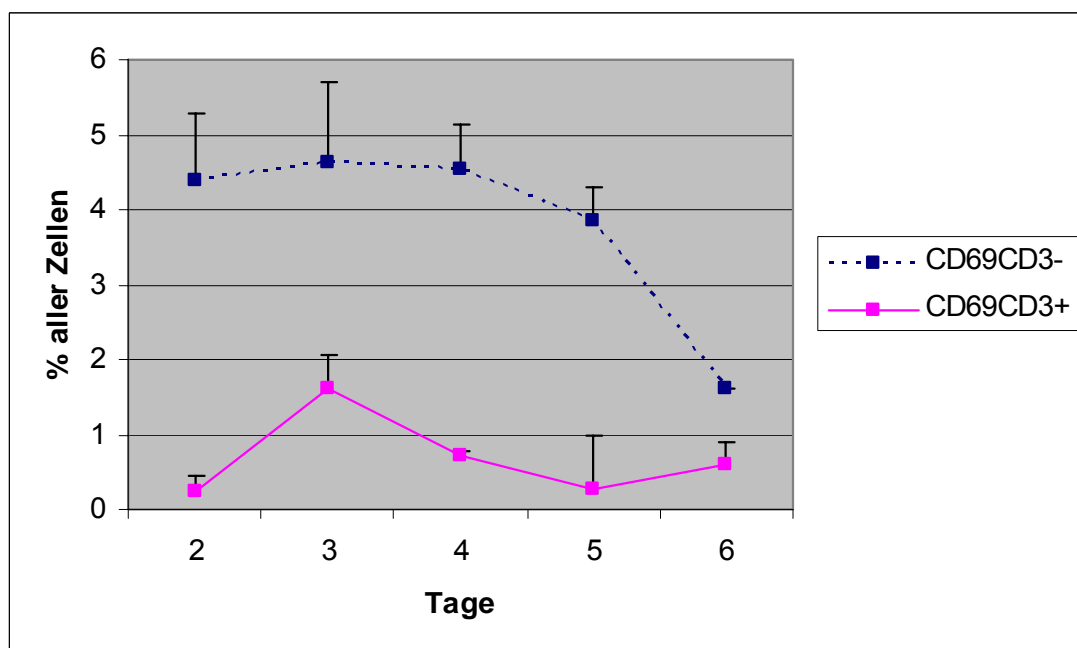


Abb.19:

Anteil der CD69-positiven PRB-Zellen nach Stimulation mit inaktivierten korrespondierenden mütterlichen Zellen. Vergleich der CD3-positiven und CD3-negativen Zellen (n=4).

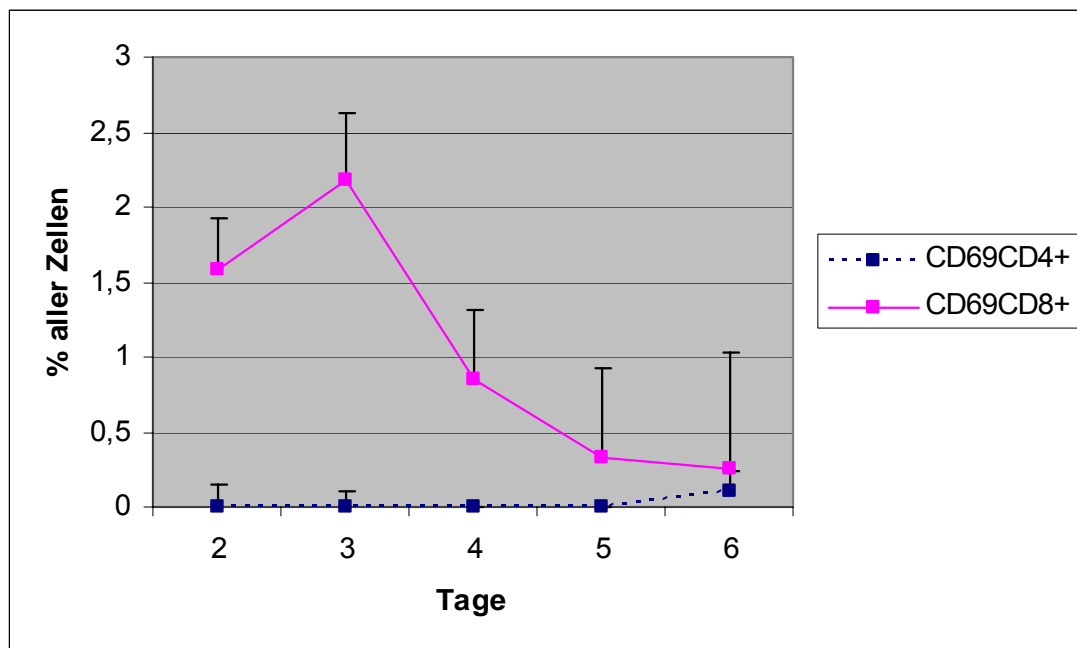


Abb. 20:

Anteil der CD69-positiven PRB-Zellen nach Stimulation mit inaktivierten korrespondierenden mütterlichen Zellen. Vergleich der CD4-positiven und CD8-positiven Zellen (n=4).

5.4.2. Untersuchungen zur MLC-Verstärkung bei teilidentischen Zellen

Um zu untersuchen, ob sich eine Verstärkung der MLC-Antwort auch bei teilidentischen Zellen erzielen lässt, führten wir eine MLC-Verstärkung mit Wachstumsfaktoren auch mit PRB-Zellen und Zellen, die den zugehörigen Müttern direkt nach Geburt abgenommen wurden, durch. Zusätzlich wurden diese Zellen mittels einer MLC gegen einen Pool gesunder Spender untersucht. Bei 24 untersuchten Proben dieser halbidentischen Spender konnte ebenfalls eine statistisch signifikante Steigerung der Thymidin-Einbaurate festgestellt werden ($p = 0,001$). Auch gegenüber dem Pool aus fremden Zellen konnte eine statistisch signifikante Steigerung der Thymidin-Einbaurate festgestellt werden ($p = 0,0001$) (Abb.21).

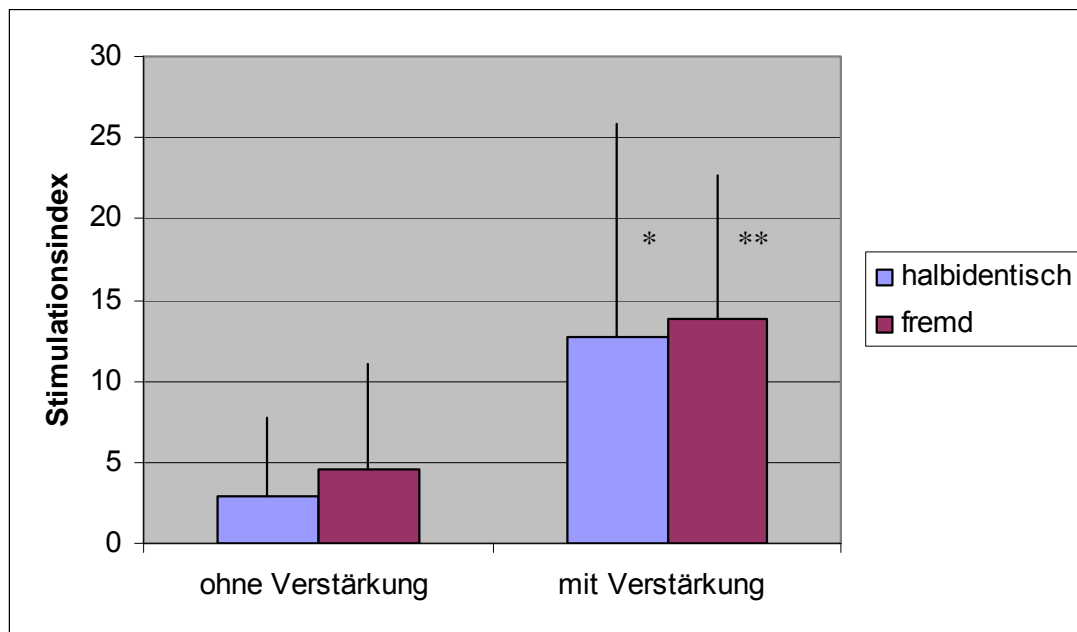


Abb.21:

Proliferationsverhalten nach Alloantigenaktivierung mit HLA-halbidentischen und HLA-inkompatiblen Zellen in der MLC mit und ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren (n=24; *p=0,001; **p=0,0001).

5.5. Retrospektive Untersuchung zur HLA-Reaktivität von teilidentisch und identisch transplantierten Patienten/Spender Paarungen

5.5.1. MLC-Verstärkung bei teilidentischen Patienten/Spender Paarungen

Um die klinische Relevanz der bisherigen Ergebnisse zu überprüfen, verglichen wir die herkömmliche MLC mit der durch Zusatz von Wachstumsfaktoren sensibler gemachten Technik.

Bei 5 teilidentisch transplantierten Patienten, die keine GvHD erlitten hatten, konnte auch mit Zugabe von SCF und IL-2 bei keiner einzigen Paarung eine statistisch signifikante Erhöhung der HLA-Antwort erzielt werden ($p = 0,424$) (Abb.22 und Tabb.5).

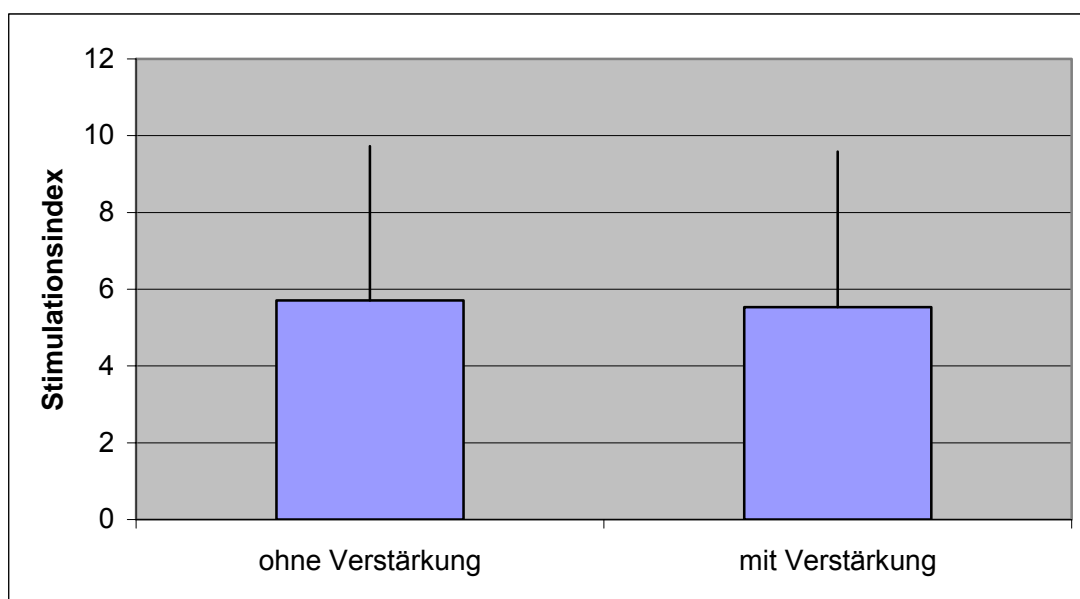


Abb.22:

Proliferationsverhalten in der MLC mit und ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren. Zellen teilentischer Spender/Empfänger Paarungen ohne GvHD beim Empfänger nach Transplantation (n=5; p=0,424).

Tab. 5:

Stimationsindex mit und ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren. Zellen teilentischer Spender/Empfänger Paarungen ohne GvHD beim Empfänger nach Transplantation (n=5):

<u>TPNR</u>	<u>Ohne Verstärkung</u>	<u>Mit Verstärkung</u>
300	8,46	8,98
211	0,76	0,80
336	1,93	1,43
254	9,10	8,57
240	8,31	7,86

Bei 4 Patienten, die nach Stammzelltransplantation an einer GvHD erkrankten, zeigte sich eine statistisch nicht signifikante Erhöhung der Reaktivität in der verstärkten MLC bei jeder einzelnen Paarung (p = 0,068) (Abb.23 und Tab.6).

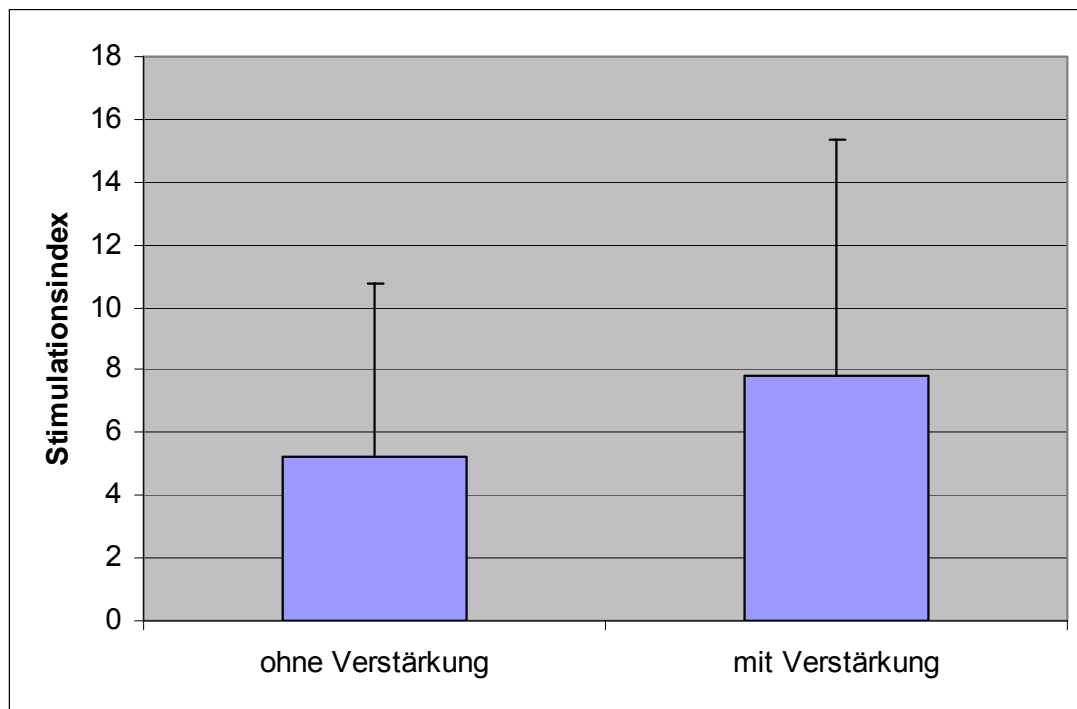


Abb.23:

Proliferationsverhalten in der MLC mit und ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren. Zellen teilentischer Spender/Empfänger Paarungen mit GvHD beim Empfänger nach Transplantation (n=4; p=0,068).

Tab. 6:

Stimationsindex mit und ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren. Zellen teilentischer Spender/Empfänger Paarungen mit GvHD beim Empfänger nach Transplantation (n=4):

TPNR	Ohne Verstärkung	Mit Verstärkung
334	13,31	18,89
305	2,78	4,04
329	3,83	5,80
226	1,04	2,45

5.5.2. MLC-Verstärkung bei HLA-identischen Patienten/Spender Paarungen

Bei HLA-identisch transplantierten Patienten, bei denen klinisch keine HLA-Reaktivität zu erwarten ist, führten wir ebenfalls eine verstärkte MLC durch, um zu testen, ob geringe HLA-Differenzen an nicht getesteten oder unbekannten Genloci durch diese Methode aufgedeckt werden können.

Bei 9 HLA-identisch transplantierten Patienten, bei denen im Verlauf keine GvHD auftrat, war bei keiner einzigen Paarung ein statistisch signifikanter Unterschied in den Ergebnissen der MLCs mit und ohne Verstärkung zu verzeichnen ($p = 0,488$) (Abb.24 und Tab.7).

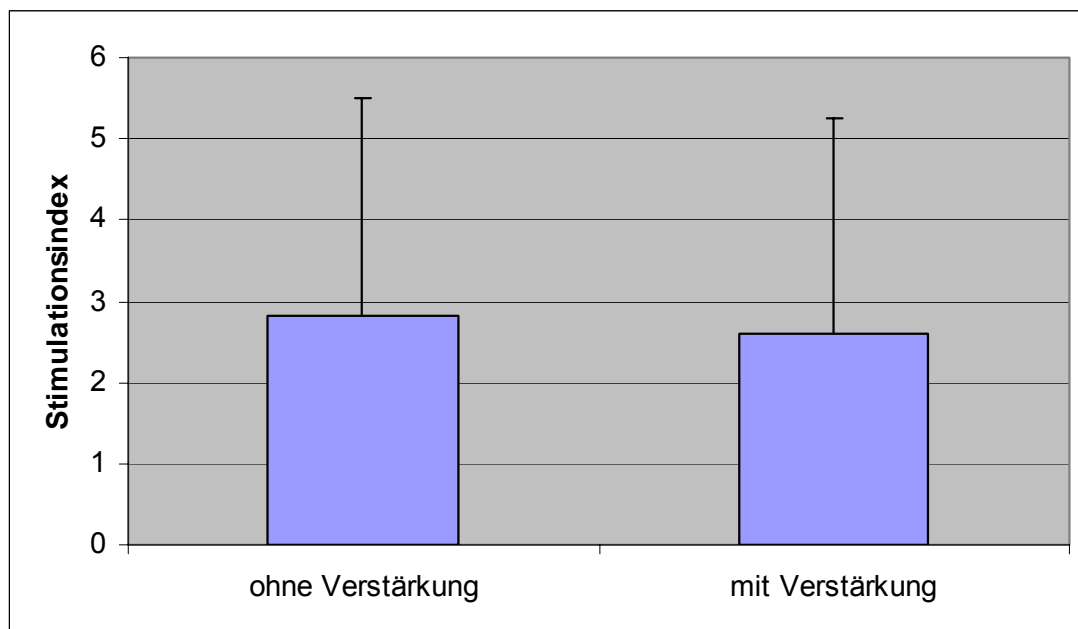


Abb.24:

Proliferationsverhalten in der MLC mit und ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren. Zellen HLA-identischer Spender/Empfänger Paarungen ohne GvHD beim Empfänger nach Transplantation (n=9; $p=0,488$).

Tab. 7:

Stimulationsindex mit und ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren. Zellen HLA-identischer Spender/Empfänger Paarungen ohne GvHD beim Empfänger nach Transplantation (n=9):

<u>TPNR</u>	<u>Ohne Verstärkung</u>	<u>Mit Verstärkung</u>
315	0,49	0,57
257	7,94	6,81
311	1,50	1,42
331	6,33	7,57
298	1,08	1,19
302	1,18	0,75
288	1,18	1,24
285	4,15	2,23
286	1,44	1,58

Bei 3 HLA-identisch transplantierten Patienten, bei denen im Verlauf eine GvHD eintrat, zeigte sich bei jeder Paarung in der verstärkten MLC ein, jedoch statistisch nicht signifikanter, Anstieg des Stimulationsindex im Vergleich zur nicht verstärkten MLC ($p = 0,109$) (Abb.25 und Tab.8).

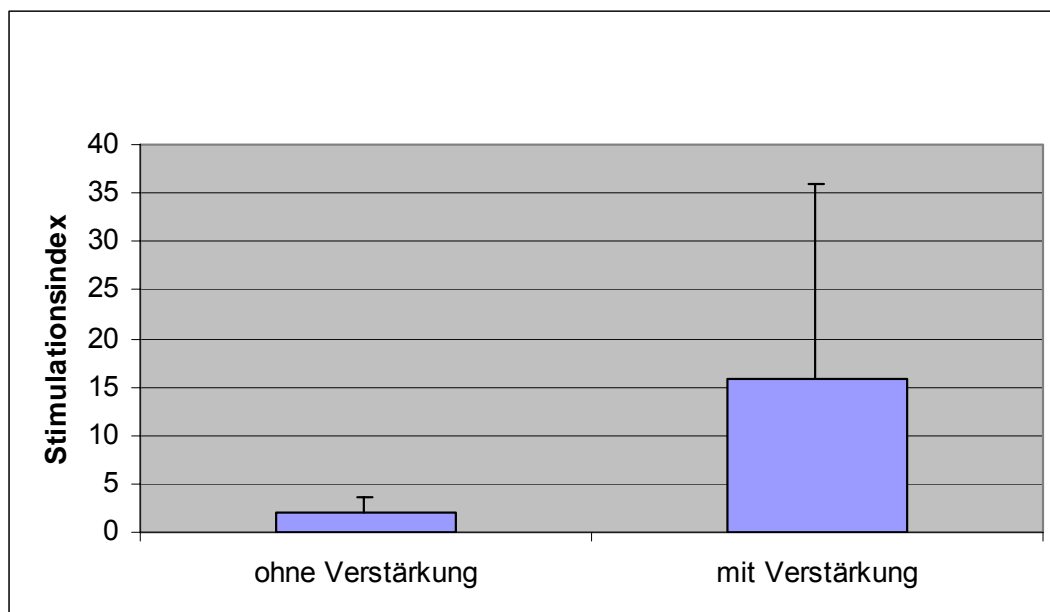


Abb.25:

Proliferationsverhalten in der MLC mit und ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren. Zellen HLA-identischer Spender/Empfänger Paarungen mit GvHD beim Empfänger nach Transplantation (n=3; $p=0,109$).

Tab. 8:

Stimulationsindex mit und ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren. Zellen HLA-identischer Spender/Empfänger Paarungen mit GvHD beim Empfänger nach Transplantation (n=3):

<u>TPNR</u>	<u>Ohne Verstärkung</u>	<u>Mit Verstärkung</u>
296	0,49	3,07
272	3,22	39,09
207	2,65	5,17

5.5.3. Separation bei teilidentisch transplantierten Patienten

Bei den teilidentisch transplantierten Patienten, die an einer GvHD erkrankten, führten wir zusätzlich eine Zellseparation mit anschließender Verstärkung durch, um zu testen, ob auch bei geringen HLA-Differenzen noch eine Reduzierung der HLA-Reaktivität durch selektive Zellseparation zu erzielen ist und ob diese effektiv ist.

Bei diesen Patienten war nach Separation eine statistisch nicht signifikante Reduzierung der MLC-Reaktivität zu verzeichnen ($p = 0,194$) (Abb.26). In der verstärkten MLC nach Separation war eine Erhöhung der Reaktivität zu verzeichnen, die statistisch signifikant war ($p = 0,021$) (Abb.27).

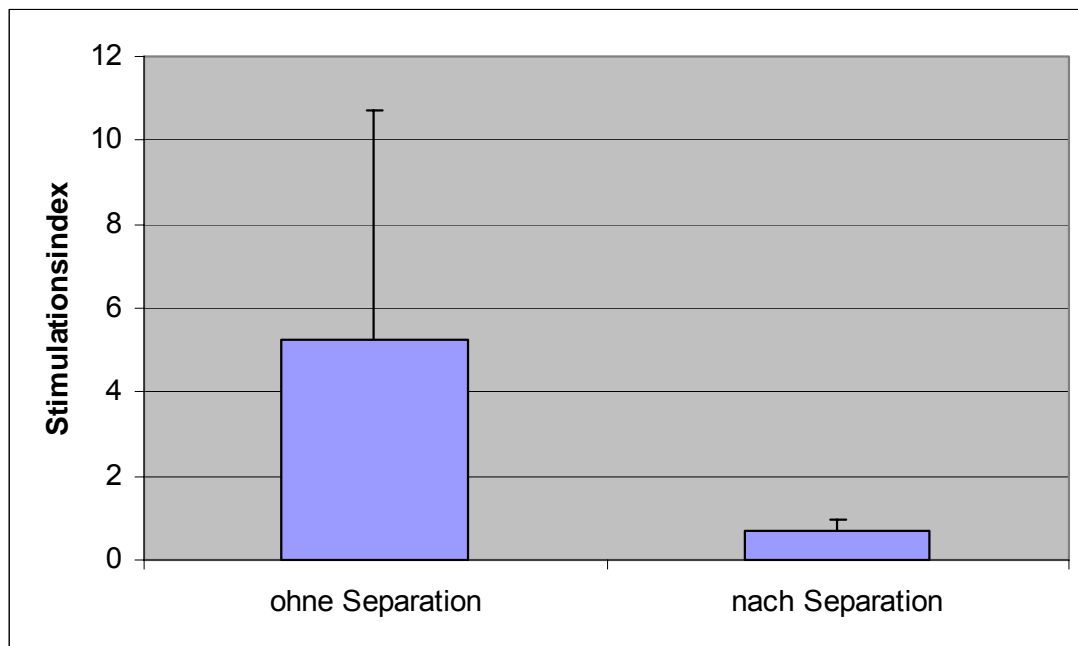


Abb.26:

Proliferationsverhalten in der MLC ohne Separation und nach Abtrennung der CD69-positiven Zellen. Teilidentische Spender/Empfänger Paarungen mit GvHD beim Empfänger nach Transplantation (n=4; p=0,194).

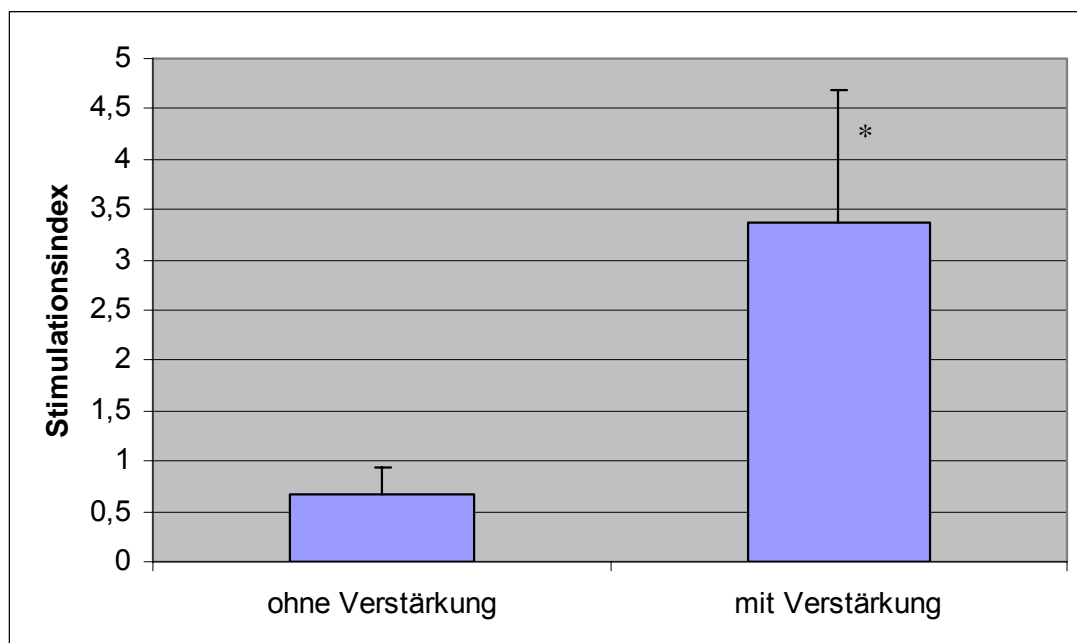


Abb.27:

Proliferationsverhalten in der MLC mit und ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren nach Separation. Zellen teilidentischer Spender/Empfänger Paarungen mit GvHD beim Empfänger nach Transplantation (n=4; p=0,021).

6. Diskussion

Bei der allogenen Stammzelltransplantation konnten durch die Gabe von CD34 positiven T-zelldepletierten Transplantaten das GvHD-Risiko und die transplantationsbedingten Komplikationen deutlich verringert werden. Jedoch ergaben sich hierbei andere Risiken, wie eine vermehrte Infektanfälligkeit durch eine verzögert einsetzende Immunkompetenz des Transplantates, ein schlechteres Anwachsen des Transplantates und ein höheres Rezidivrisiko bei malignen Erkrankungen. Um diesen Komplikationen zu begegnen, werden DLI nach Stammzelltransplantation durchgeführt, die aber wiederum das GvHD-Risiko erhöhen. Um dieses Risiko zu verringern, sind verschiedene Möglichkeiten einer DLI-Modifikation untersucht worden.

In einigen Untersuchungen wurde gezeigt, dass es möglich ist, spezielle T-Lymphozyten gegen bestimmte Erreger zu schaffen, die nach Stammzelltransplantation verabreicht werden können. Dadurch wird die Abwehrfunktion des Immunsystems gegen diese Erreger rasch wieder hergestellt. Wenn in diesem Falle statt aller T-Zellen des Spenders nur die speziellen Klone gegen EBV- oder CMV-Viren gegeben werden, ist das Risiko einer GvHD deutlich minimiert und die Infektabwehr gegen diese Erreger dennoch gewährleistet (Reusser *et al.* 1997; Riddell *et al.* 1991; Riddell und Greenberg 1997; Rooney *et al.* 2001; Walter *et al.* 1995). Jedoch ergibt sich das Problem, dass in diesem Falle die anderen Komplikationen, wie Transplantatversagen oder Tumorrezidiv, denen mit einer DLI begegnet wird, nicht behoben werden und auch nur die speziellen Infektionen, gegen die T-Zell Klone vorhanden sind, bekämpft werden können. Zudem sind die Verfahren zur Erlangung solcher T-Zell Klone sehr aufwendig und daher im klinischen Alltag schwer praktikabel.

Andere Möglichkeiten der T-Zell-Modifikation bestehen darin, diese vor DLI anerg gegenüber dem Empfänger zu machen, so dass keine Alloreaktivität der Lymphozyten mehr vorliegt. Dies konnte mit CTLA-4-Immunglobulin oder Cyclosporin A alleine oder in Kombination erreicht werden. In vitro konnte damit das GvHD-Risiko minimiert und dennoch die allgemeine T-Zell-Funktion erhalten werden (Gribben *et al.* 1996).

Des Weiteren wurde versucht, die alloreaktiven Zellen vor DLI mit einem Immunotoxin abzutöten, oder mittels bestimmter Oberflächenantigene, wie CD25, CD69, CD71, CD147 oder HLA-DR abzutrennen. Auch hierbei konnte bei Verminderung der GvHD-Gefahr die T-Zell Aktivität gegen Infektionen oder Tumorzellen in vitro erhalten werden (Amrolia *et al.* 2003; Cavazzana-Calvo *et al.* 1990; Chen *et al.* 2002; Kreitman *et al.* 1994; Mavroudis *et al.* 1996; Mavroudis *et al.* 1998; Montagna *et al.* 1999; Rettinger *et al.* 2004; van Dijk *et al.* 1999).

In Anlehnung an diese Ergebnisse untersuchten wir die Möglichkeiten einer Abtrennung HLA-reaktiver Zellen anhand des Aktivierungsmarkers CD69.

6.1. Ermittlung des optimalen Separationszeitpunktes

Um den optimalen Zeitpunkt für die Abtrennung der HLA-reaktiven Zellen anhand des Aktivierungsmarkers CD69 zu bestimmen, führten wir zunächst an mehreren Tagen eine Durchflußzytometrie nach HLA-Antigenstimulation durch. Hierbei bestimmten wir den Tag der maximalen CD69-Expression. Außerdem untersuchten wir die Zellen mittels BrdU-Einbau-Assay an mehreren Tagen nach Antigenstimulation auf ihr Proliferationsverhalten, um herauszufinden, ab welchem Tag die Zellproliferation einsetzt.

6.1.1. Die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 nach HLA-Antigenstimulation

In der Durchflußzytometrie wurde der Anteil derjenigen Zellen an der Gesamtpopulation gemessen, der nach HLA-Antigenstimulation in einer MLC den Aktivierungsmarker CD69 trug. Wie man in Abb. 3 sieht, fand sich in unseren Untersuchungen eine maximale CD69-Expression erst am 5. Tag nach Ansetzen der MLC. Rettinger *et al.* (2004) fanden eine maximale Expression von

Aktivierungsmarkern bereits nach 72 Stunden, was sich mit den Ergebnissen von Amrolia *et al.* (2003) deckt. Andere Gruppen fanden eine maximale CD69-Expression bereits noch etwas eher (Cavazzana-Calvo *et al.* 1990; Fehse *et al.* 2000b; Fehse *et al.* 2000a; Godfrey *et al.* 2004). In einigen Arbeiten zeigte sich, dass die Expression von Aktivierungsmarkern noch mindestens 96 Stunden nach Ansetzen der MLC fortschreiten kann, und dass unterschiedliche Zellpopulationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten maximal aktiviert sind (Fehse *et al.* 2000b; Fehse *et al.* 2000a). So fanden sie, dass CD25-positive Zellen nach 72 Stunden eine maximale Aktivierung zeigen, wogegen CD69-positive Zellen schon nach 48 Stunden ihr Maximum erreichen. Unter diesen Zellen fanden sie eine große Anzahl an T-Zellen und nur wenige B-Zellen. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Zeiträume bis zur maximalen Aktivierung in unseren und anderen Untersuchungen könnten ein Unterschied in den Kultivierungsbedingungen und die Untersuchung unterschiedlicher Zellpopulationen oder unterschiedlicher Aktivierungsmarker wie CD25, CD69 und HLA-DR sein. So verwendeten einige Gruppen ein serumfreies Medium oder fetales Kälberserum (FKS), während wir und andere Gruppen Humanserum für das Medium verwendeten.

Wir konnten zeigen, dass diejenigen Zellen, die neben dem Aktivierungsmarker CD69 nicht noch zusätzlich CD3 auf ihrer Oberfläche exprimierten, zahlenmäßig den größten Anteil der alloreaktiven Zellen ausmachten. Dies steht im Gegensatz zu der allgemein verbreiteten Auffassung, dass die CD3-positiven T-Zellen die hauptverantwortlichen Zellen im Rahmen einer GvHD sind. Allerdings lässt sich diese Tatsache evtl. dadurch erklären, dass die T-Zellen als Bestandteil des spezifischen Abwehrsystems erst einige Tage nach Antigenkontakt des Individuums über antigenpräsentierende Zellen in den Lymphknoten aktiviert werden, und das unspezifische Abwehrsystem mit den CD3-negativen Zellen immer zuerst reagiert (Janeway Ch.A. *et al.* 2002). Demnach wäre ein Anstieg der CD69CD3-positiven Zellen erst später zu erwarten, als ein Anstieg der CD69-positiven Zellen, die CD3 negativ sind. Des Weiteren sind unsere Untersuchungen *in vitro* durchgeführt worden, weshalb unter Umständen nicht alle Kofaktoren vorhanden waren, die bei der T-Zellaktivierung durch antigenpräsentierende *in vivo* Zellen nötig sind. Dies würde ebenfalls eine geringere Aktivierung der CD3-positiven Zellen gegenüber den CD3-negativen Zellen erklären.

6.1.2. Die Proliferationsinduktion nach HLA-Antigenstimulation

Um die Zellen zu einem Zeitpunkt der maximalen Expression von Aktivierungsmarkern, aber noch vor Einsetzen einer massiven Proliferation zu separieren, ermittelten wir die Proliferationsraten nach HLA-Antigenstimulation an aufeinander folgenden Tagen mittels BrdU-Einbau-Assay. In Abb. 4 zeigte sich ein statistisch signifikanter ($P=0,009$) Anstieg in der Proliferationsrate vom vierten auf den fünften Tag nach Ansetzen der MLC aus frischen Zellen, was sich mit den Ergebnissen von Godfrey *et al.* (2004) deckt. Anhand der Ergebnisse dieser Untersuchungen und der Untersuchungen der Durchflußzytometrie, bei denen sich eine maximale CD69-Expression am 5. Tag nach HLA-Antigenstimulation zeigte (Abb. 3), wurde die Entscheidung getroffen, die Zellseparation bei frischen Zellen am vierten Tag nach Ansetzen der MLC durchzuführen, da zu diesem Zeitpunkt bereits eine Zellaktivierung einsetzte, jedoch noch keine starke Zellvermehrung stattgefunden hatte.

Wie in Abb. 5 dargestellt, zeigt sich bei den kryokonservierten Zellen im Vergleich zu den frischen Zellen kein sprunghafter Anstieg in der Proliferationsrate. Dies legt die Vermutung nahe, dass die einzelnen Zellen möglicherweise unterschiedlich viel Zeit benötigen, um sich nach dem Auftauen wieder zu regenerieren. Aus diesem Grunde erscheint es uns sinnvoll, zukünftig die Zellen bereits vor dem Einfrieren zu separieren, da es ansonsten deutlich schwerer ist, einen optimalen Separationszeitpunkt zu finden. Falls dies aus bestimmten Gründen nicht möglich sein sollte, wäre zu empfehlen, die kryokonservierten Zellen vor Ansetzen der MLC zunächst einen Tag zur Regenerierung in Medium im Brutschrank zu kultivieren.

6.2. Untersuchungen zur Möglichkeit einer Verstärkung der MLC-Antwort

Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass eine hohe Reaktivität in der MLC nicht unbedingt mit dem Auftreten einer GvHD korreliert ist, und eine niedrige Reaktivität umgekehrt keinen sicheren Schutz vor dieser bietet (DeGast *et al.* 1992; Feig *et al.* 1976; Mickelson *et al.* 1994). Es war Ziel dieser Arbeit, zu testen, ob es möglich ist,

durch eine Modifizierung der MLC eine geringe HLA-Reaktivität, die in der normalen MLC nicht entdeckt werden würde, zu erkennen und somit das Risiko einer GvHD bei HLA-identischer Transplantation besser abschätzen zu können. In den Untersuchungen der Durchflußzytometrie konnten wir zeigen, dass der größte Teil der aktivierten Zellen nicht der T-Zellpopulation angehört. Daher führten wir die Verstärkung der MLC nicht nur mit IL-2, welches die T-Zellen stimuliert, sondern auch noch mit SCF, welches diejenigen Zellen zur Proliferation anregt, die nicht der T-Zellpopulation angehören, durch. Wir fanden, dass bei gesunden fremden Spendern durch Verstärkung der MLC mit den Wachstumsfaktoren SCF und IL-2 noch eine statistisch signifikante ($P=0,002$) Steigerung der Proliferationsrate, gemessen als Thymidineinbaurate, zu erzielen war. Dies deckt sich mit Untersuchungen von anderen Gruppen die zeigten, dass die MLC-Antwort durch Zusatz von Zytokinen noch verstärkt werden konnte (Bishara *et al.* 1994; Bishara *et al.* 1999).

Bei diesen Untersuchungen verwendeten wir nur Zellen gesunder, HLA-fremder Spender, die dadurch eine allgemein sehr hohe HLA-Reaktivität aufweisen. In später aufgeführten Daten mit Zellen aus HLA-haploidentischen und HLA-identischen Paarungen konnten wir zeigen, dass diese MLC-Verstärkung nicht nur zu einer allgemeinen Hochregulierung der Zellproliferation führt, sondern tatsächlich bei der Testung unbekannter HLA-Differenzen einen prädiktiven Wert hat (Abb. 25).

6.3. Untersuchungen zur Zellfunktion und zur HLA-Reaktivität vor und nach Separation

Nach Transplantation von T-zelldepletierten Stammzellen zur Verminderung des GvHD-Risikos und des transplantationsbedingten Multiorganversagens kam es vermehrt zum Auftreten von Transplantatversagen, Infektionen und Tumorrezidiven (Hessner *et al.* 1995). zZur Überwindung dieser Komplikationen werden DLI durchgeführt (Klingebiel *et al.* 2004), welche das GvHD-Risiko wiederum erhöhen. Aus diesen Gründen wurden Möglichkeiten gesucht, eine DLI so zu modifizieren, dass die Immunkompetenz der Zellen intakt bleibt und das GvHD-Risiko trotzdem möglichst gering gehalten werden kann.

Edinger *et al.* (2003) konnten in Ihren Untersuchungen eine Unterdrückung der GvHD bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der GvL-Aktivität durch Übertragung von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen nachweisen. Montagna *et al.* (1999) zeigten, dass die Beseitigung der Alloreaktivität zu keinem statistisch signifikanten Rückgang des antiviralen Effektes führte, und Amrolia *et al.* (2003) konnten nachweisen, dass auch der GvL-Effekt nicht verloren geht. Diese Untersuchungen decken sich auch mit den Untersuchungen anderer Gruppen, welche die Zellfunktion zum Teil mit anderen Methoden nach der Separation testeten und dabei fanden, dass durch die Abtrennung HLA-reaktiver Zellen die Funktionsfähigkeit des Transplantates gegenüber Krankheitserregern, Zellen anderer Kompartimente oder Leukämiezellen nicht beeinträchtigt war (Bacigalupo 2004; Cavazzana-Calvo *et al.* 1990; Fehse *et al.* 2000b; Fehse *et al.* 2000a; Michalek *et al.* 2003; van Dijk *et al.* 1999).

Rettinger *et al.* (2004) konnten nach magnetischer Zellseparation anhand eines Aktivierungsmarkers einen deutlichen Rückgang der aktivierten Zellen von 2,1%-52,3% auf 0,1%-1,1% nachweisen.

Auch in unseren Versuchen fanden wir, wie in Abb. 10 dargestellt, nach Zellseparation einen statistisch signifikanten ($P=0,001$) Rückgang aller aktivierten Zellen um 2/3 von 9% auf 2,8% und einen ebenfalls statistisch signifikanten ($P=0,0001$) Rückgang der aktivierten CD3-negativen Zellen von 6,1% auf 0,5%. Diese Ergebnisse ließen sich auch noch in den Untersuchungen weiterer Gruppen bestätigen (Fehse *et al.* 2000b; Fehse *et al.* 2000a; Koh *et al.* 1999). Bei den aktivierten CD3-positiven Zellen konnten wir jedoch statistisch signifikanten Rückgang der Aktivierungsmarkerexpression feststellen. Dies lässt sich unter Umständen dadurch erklären, dass die T-Zellen zum Zeitpunkt der Separation noch nicht maximal aktiviert sind, und daher nur ein geringer Teil dieser Zellen abgetrennt werden kann. Erst zu einem Zeitpunkt, zu dem die Zellseparation bereits stattgefunden hat, setzt die maximale T-Zellaktivierung ein. Daher müsste man zur Abtrennung HLA-reaktiver T-Zellen evtl. zu einem späteren Zeitpunkt nochmals separieren.

Wir fanden, wie in Abb. 9 zu sehen ist, nach selektiver T-Zelldepletion auch einen statistisch signifikanten ($P=0,0001$) Rückgang der Zellproliferation von 14,14 auf 3,2,

den wir anhand des BrdU-Einbaus einer sekundären MLC ermittelten. Dies deckt sich mit einer großen Anzahl anderer Untersuchungen, die z. T. andere Methoden zur T-Zelldepletion und Messung der HLA-Reaktivität verwendeten, oder die GvHD in einem Tiermodell nach Stammzelltransplantation bestimmten (Amrolia *et al.* 2003; Cavazzana-Calvo *et al.* 1990; Chen *et al.* 2002; Fehse *et al.* 2000b; Fehse *et al.* 2000a; Gribben *et al.* 1996; Koh *et al.* 1999; Koh *et al.* 2002; Li *et al.* 2004; Mavroudis *et al.* 1996; Mavroudis *et al.* 1998; Michalek *et al.* 2003; Montagna *et al.* 1999; Soiffer *et al.* 1992; Valteau-Couanet *et al.* 1992; van Dijk *et al.* 1999). So zeigten Amolia *et al.* (2003) und Michalek *et al.* (2003) einen Rückgang der Alloreaktivität nach Inkubation mit einem Immunotoxin gegen CD25. Mavroudis *et al.* (1996; 1998) und Montagna *et al.* (1999) zeigten dies mit einem Immunotoxin gegen den IL-2-Rezeptor, Chen *et al.* (2002) mittels photodynamischer Zellreinigung und Godfrey *et al.* (2004) nach magnetischer Zellseparation anhand von CD25. Rettinger *et al.* (2004) und andere Gruppen (van Dijk *et al.* 1999) konnten zeigen, dass sich der Effekt durch kombinierte Separation anhand mehrerer Marker noch verbessern lässt. Es stellt sich jedoch die Frage, ob durch verschiedene Aktivierungsmarker tatsächlich eine größere Anzahl alloreaktiver Zellen erfasst werden kann, oder ob es sich dabei nur um unterschiedliche Stadien in der Aktivierung einer Zellpopulation handelt. Clausen *et al.* (2003) konnten nämlich zeigen, dass CD69 ein Marker für die zytotoxische Aktivität einer Zelle ist, und CD25 einen Proliferationsmarker darstellt. Doch auch in diesem Falle könnte durch eine Separation anhand mehrerer Marker ein Vorteil zu erzielen sein, da dadurch auch Zellen erfasst werden könnten, die sich bereits in unterschiedlichen Stadien des Aktivierungs- und Proliferationszyklus befinden.

Amrolia *et al.* (2003) konnten zeigen, dass eine Stimulation der Spender T-Zellen mit lymphoblastischen Zelllinien vor Separation noch effektiver als mit peripheren MNC ist. Jedoch ergibt sich bei dieser Methode im klinischen Alltag das Problem, dass nicht geklärt ist, welche möglichen Auswirkungen evtl. mitübertragene Zellen der lymphoblastischen Zelllinie längerfristig auf den Empfängerorganismus haben.

Klinische Studien zur Überprüfung der Umsetzbarkeit dieser Laborergebnisse in den Alltag werden bereits von einigen Gruppen durchgeführt (Andre-Schmutz *et al.* 2002; Cavazzana-Calvo *et al.* 1996; Gribben *et al.* 1996). Es wird sich zeigen, ob diese Studien die in vitro erzielten Ergebnisse bestätigen können.

Obwohl, wie in Abb. 10 zu sehen, der Anteil der aktivierten Zellen nur um 2/3 zurückging, zeigte sich in der MLC ein Rückgang der Proliferation um mehr als $\frac{3}{4}$ (Abb. 9). Dies lässt sich unter Umständen dadurch erklären, dass mittels Zellseparation vermehrt diejenigen Zellen abgetrennt wurden, die eine hohe Dichte des Aktivierungsmarkers und eine starke Proliferationsneigung zeigten, während die nach Separation noch vorhandenen aktivierten Zellen nur eine geringe Dichte des Aktivierungsmarkers und nur eine geringe Proliferationsneigung aufwiesen. Es war uns nicht mehr möglich, diese These nachzuvollziehen, da nach Abschluss unserer Untersuchungen eine Geräteumstellung erfolgte und wir somit keinen Zugriff mehr auf die Originaldaten auf der Festplatte hatten. Die Originalausdrucke enthielten leider keine Angaben über die Antigendichte auf der Zelloberfläche.

Wir testeten, ob der Rückgang der aktivierten Zellen und der Zellproliferation nach Separation evtl. nur durch die viertägige Kultivierung der Zellen bis zur Separation und dem Ansetzen der MLC bedingt war und nicht eine Folge der selektiven Zellseparation. Hierzu kultivierten wir die Zellen vier Tage lang in Medium und setzten dann ohne vorherige Zellseparation eine MLC an. Wir konnten zeigen, dass der Rückgang der MLC-Reaktivität nicht durch die Zeitspanne bedingt war, die bis zur Separation verging. Es zeigte sich dagegen sogar (Abb. 7), dass sich die MLC-Reaktivität sogar noch statistisch signifikant ($P=0,011$) erhöhte, wenn man die Zellen vor Ansetzen der MLC vier Tage in Medium kultivierte, ohne sie anschließend zu separieren. Dies könnte unter Umständen darauf zurückzuführen sein, dass die Zellen durch vorherige Kultivierung im Medium für vier Tage sofort bei Kontakt mit HLA-fremden Zellen anfangen zu proliferieren und keine Zeit mehr vergeht, bis sich die Zellen an das Medium angepasst haben. Andererseits könnte es auch sein, dass das Medium selbst durch das darin verwendete Serum, das aus einem Pool mehrerer Spender gewonnen wurde, antigene Eigenschaften besitzt und bei der vier Tage dauernden Kultivierung die Zellen zur Proliferation anregte. Bei klinischer Anwendung der Zellseparation müsste man statt eines Serumpools mehrere Spender zur Herstellung des Medium Serum des Spenders bzw. des Empfängers verwenden, um eine Aktivierung HLA-reaktiver Zellen durch fremdes Serum zu vermeiden.

Zur Testung der Immunkompetenz der Zellen nach Separation verwendeten wir einen LTT. In unseren Untersuchungen war noch eine gute Immunkompetenz der

separierten Zellen gegen Mitogene nachweisbar. Die Ergebnisse des LTT, der zur Testung der Reaktionsfähigkeit vor und nach Separation herangezogen wurde, zeigten keinen statistisch signifikanten ($P=0,083$) Unterschied in diesen beiden Gruppen (Abb. 8). Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen von Bacigalupo (2004) und anderen Gruppen (Cavazzana-Calvo *et al.* 1990; Fehse *et al.* 2000b; Fehse *et al.* 2000a; Michalek *et al.* 2003; van Dijk *et al.* 1999). Allerdings ist der LTT ein sehr unspezifischer Test und trifft keine konkreten Aussagen über die Fähigkeit der Zellen zur Infektabwehr oder zum GvL-Effekt. Um zu Bestätigen, dass die allgemeine Funktion der T-Zellen gegenüber Krankheitserregern und Tumorzellen, sowie deren regulatorische Funktion im Rahmen der Immunabwehr nach Separation nicht entscheidend gestört ist, müssten noch spezifischere Test unternommen werden. So könnte man die Reaktivität gegen Zellen, die mit CMV oder EBV infiziert sind, oder aber die Reaktivität gegen Tumorzelllinien testen.

6.3.1. Untersuchungen zur HLA-Bindung der Zellseparation

Ein weiteres Ziel war es zu überprüfen, ob es eine Gruppe von Zellen gibt, die immer bei einer HLA-Antigenaktivierung reagieren und die damit unspezifisch abgetrennt werden können, oder ob die aktivierten Zellen HLA-Antigen spezifisch sind und somit bei jeder Spender/Empfänger-Kombination individuell separiert werden müssen.

Breur-Vriesendorp *et al.* (1990) fanden in ihren Untersuchungen heraus, dass es sowohl „enge Antwort“ gibt, die zytotoxische T-Zellen produzieren, die nur ihr persönliches Stimulator-Alloantigen erkennen, als auch „breite Antwort“, die vorzugsweise kreuzreagible zytotoxische T-Zellen produzieren, die gegen eine große Anzahl verschiedener Alloantigene reagieren. Es schien so, als ob diese Unterschiede nicht vom HLA-Typ abhängig sind, sondern vielmehr interindividuell unterschiedlich sind.

Wir fanden wie in Abb. 11 zu sehen ist, dass sich bei Restimulation nach Separation mit einem anderem Spender, der nicht zur HLA-Antigenaktivierung vor Separation verwendet wurde, nochmals eine statistisch nicht signifikante ($P = 0,081$) Erhöhung des SI von 3,18 auf 5,07 nachweisen ließ. Dies lässt darauf schließen, dass die HLA-Antigenaktivierung HLA-Typ gebunden ist und bei jeder Empfänger-Spender Kombination andere Zellen aktiviert werden. Somit ist es nicht möglich, unspezifisch

alloreaktive Zellen aus einem Transplantat abzutrennen, ohne dass der entsprechende Empfänger bekannt ist. Bei der Umsetzung dieser Methode in den klinischen Alltag müssen für jede Spender/Empfänger-Kombination die für diese Paarung spezifischen alloreaktiven Zellen aktiviert und dann vor Transplantation abgetrennt werden. Dazu ist es notwendig, vor Konditionierung eine ausreichende Anzahl Empfängerzellen zu sammeln, die dann für die HLA-Antigenaktivierung verwendet werden können.

6.3.2. Untersuchungen zur Rest-HLA-Reaktivität nach Separation

Bei Patienten, die eine Knochenmarktransplantation erhalten, ist durch die Konditionierung eine erhöhte Zytokinkonzentration im Blut messbar. Wie wir anhand der MLC-Verstärkung mit Wachstumsfaktoren zeigen konnten, kann durch die Zugabe von Zytokinen zur MLC noch eine höhere Proliferationsrate der Zellen erzielt werden. Dies könnte auch zur Folge haben, dass bei einer Umsetzung der Separationsmethode in die Klinik auch der geringe Anteil an HLA-reaktiven Zellen, die nach Separation noch vorhanden sind, zum Entstehen einer GvHD führen kann. Aus diesem Grunde führten wir nach Separation noch eine verstärkte MLC bei Restimulation mit dem gleichen Spender durch und verglichen diese Ergebnisse mit den Ergebnissen der MLC bei Restimulation mit dem gleichen Spender, bei der keine Verstärkung durch Zytokine durchgeführt wurde.

Wir fanden, wie in Abb. 12 zu sehen ist, dass durch eine verstärkte MLC nach Separation die MLC-Antwort, die anhand des Stimulationsindex gemessen wurde, wiederum von 2,21 auf 11,25 statistisch signifikant ($P=0,003$) gesteigert werden konnte. Dies gibt Hinweise darauf, dass auch nach Separation noch eine große Anzahl HLA-reaktiver Zellen im Transplantat verbleibt, die dann in vivo bei Vorhandensein von Zytokinen eine GvHD bewirken können. Auch in anderen Untersuchungen fanden sich nach Separation noch relativ hohe Anteile an alloreaktiven Zellen (Fehse *et al.* 2000b). Dies zeigt, dass eine einmalige Zellseparation anhand eines einzigen Oberflächenantigens nicht ausreicht, alle alloreaktiven Zellen aus der Probe zu entfernen.

Wie bereits bei den Ergebnissen der Durchflußzytometrie aufgeführt, zeigen unterschiedliche Zellpopulationen an verschiedenen Tagen ihr Maximum der HLA-Antigenaktivierung. Somit könnte eine Zellseparation an mehreren Tagen zu einer besseren Reduktion der alloreaktiven Zellen führen. Auch konnten Rettinger *et al.* (2004) und andere Gruppen (van Dijk *et al.* 1999) noch einen deutlichen Rückgang der HLA-Reaktivität bei Separation anhand mehrerer Marker verzeichnen. Es bleibt zu prüfen, ob durch die Verwendung mehrerer Antikörper zur Separation, eine mehrfache Separation an verschiedenen Tagen oder auch durch die Verstärkung der MLC bereits vor Separation der Anteil an im Transplantat verbleibenden HLA-reaktiven Zellen und damit das Risiko einer GvHD noch weiter vermindert werden kann.

6.4. Modell für haploidentische Paarungen

In den oben aufgeführten Untersuchungen wurden nur Zellen gesunder Spender, die nicht miteinander verwandt sind, verwendet. Da im klinischen Alltag jedoch keine HLA-fremden Stammzelltransplantationen durchgeführt werden, führten wir als Modell für haploidentische Paarungen auch Untersuchungen auch an PRB-Zellen und dem dazugehörigen mütterlichen Blut durch.

6.4.1. CD69-Expression bei teilidentischen Zellen nach HLA-Antigenstimulation

Zunächst untersuchten wir PRB und mütterliches Blut nach HLA-Antigenstimulation an verschiedenen Tagen darauf, wann und in welchem Maße eine Zellaktivierung anhand des Aktivierungsmarkers CD69 zu verzeichnen ist. Bei den mütterlichen Zellen fand sich, im Gegensatz zu den Zellen gesunder fremder Spender (Abb.3), gegen fremde Zellen kein Maximum der CD69-Expression innerhalb unseres Beobachtungszeitrahmens. Gegenüber den PRB-Zellen zeigte sich bei den CD3-

negativen Zellen am 5. Tag ein Gipfel der CD69-Expression, die CD3-positiven Zellen stiegen ab dem 4. Tag langsam an, ohne ein Maximum zu erreichen (Abb. 13 und 14). Diese Ergebnisse und der insgesamt deutlich niedrigere Anteil der CD69-positiven Zellen auch gegen fremde Zellen im Vergleich zu den gesunden Spendern lassen sich unter Umständen durch eine Toleranzinduktion während der Schwangerschaft erklären. Da das verwendete mütterliche Blut den Müttern unmittelbar nach der Geburt abgenommen wurde, ist anzunehmen, dass ein Effekt der während der Schwangerschaft gebildeten inhibitorischen Faktoren auf das Immunsystem noch vorhanden war. Auch in anderen Untersuchungen konnte eine Toleranz gegenüber mütterlichen Antigenen festgestellt werden. Van Rood *et al.* (2002) zeigten in einer klinischen Studie, dass bei teilidentischer Transplantation mit fehlender Übereinstimmung bezüglich mütterlicher Antigene die Rate an GvHD und transplantationsbedingter Komplikationen deutlich geringer war, als bei fehlender Übereinstimmung bezüglich väterlicher Antigene. Tsafirir *et al.* (2000) konnten zudem zeigen, dass PRB-Zellen bei einem nicht Übereinstimmen an einem HLA-II-Genort eine deutlich geringere MLC-Reaktivität gegenüber mütterlichen als gegenüber väterlichen oder fremden MNC zeigten. Dies unterstützt wiederum die These, dass während der Schwangerschaft eine gewisse Toleranz zwischen Mutter und Kind induziert wird. Andere Arbeitsgruppen konnten diese Untersuchungsergebnisse jedoch nicht bestätigen (Falkenburg *et al.* 1996).

Bei den PRB-Zellen fand sich gegenüber fremden Antigenen innerhalb unseres Untersuchungszeitrahmens keine nennenswerte Aktivierung der CD3-negativen Zellen und ein Anstieg des Aktivierungsmarkers der CD3-positiven Zellen ab dem 2. bis 5. Tag mit einem Maximum, das nicht innerhalb des Beobachtungszeitraumes lag (Abb. 17). Eine Erklärung dafür mag darin liegen, dass die PRB-Zellen, im Gegensatz zu den sonst verwendeten MNC, noch keine Antigenprägung erfahren haben. Eine Antigenprägung ist für die Immunkompetenz der Zellen erforderlich. HLA-Antigenaktivierung kann nur bei immunkompetenten Zellen erfolgen.

Gegenüber den mütterlichen Zellen fand sich bei den CD3-negativen Zellen bereits am 2. Tag ein sehr großer Anteil aktivierter Zellen, die dann allmählich abfielen. Die aktivierten CD3-positiven Zellen hatten ihr Maximum bereits am 3. Tag nach Antigenstimulation, wobei es sich hierbei fast ausschließlich um CD8-positive Zellen handelte (Abb. 19). Im Gegensatz dazu war bei allen anderen Kombinationen eine in

etwa gleiche Verteilung der CD4 und CD8 Zellen anzutreffen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass in PRB im Gegensatz zu peripheren MNC ein sehr hoher Anteil unreifer Zellen und IL-2-aktivierter zytotoxischer T-Zellen (Eisenthal *et al.* 2003) zu finden ist. Diese Zellen hatten während der gesamten Schwangerschaft schon Kontakt zu mütterlichen Antigenen und sind daher evtl. bereits zu einem relativ frühen Zeitpunkt maximal aktiviert, da der Antigenkontakt bereits vor HLA-Antigenaktivierung *in vitro* stattgefunden hatte und sich möglicherweise Gedächtniszellen gebildet haben können, was zu einer schnelleren Immunantwort führt.

Aus diesen Gründen scheinen Ergebnisse, die anhand von Untersuchungen zwischen PRB und MNC der Mütter gewonnen wurden, nicht auf andere Spender/Empfänger-Kombinationen übertragbar zu sein.

Alle unsere Untersuchungen zur Expression des Aktivierungsmarkers CD69 bei PRB und mütterlichen Zellen wurden jedoch an einem relativ geringen Kollektiv durchgeführt, so dass die Aussagefähigkeit dieser Untersuchungen nicht eindeutig ist.

6.4.2. Untersuchungen zur MLC-Verstärkung bei teilidentischen Zellen

Um unsere Ergebnisse mit Zellen gesunder Spender, die HLA-fremd sind, noch auf teilidentische Spender/Empfänger-Kombinationen auszudehnen, führten wir eine MLC-Verstärkung mit PRB und mütterlichen Zellen durch, die HLA-haploidentisch sind.

Auch hierbei zeigte sich, wie in Abb. 21 zu sehen ist, dass durch eine Zugabe von Wachstumsfaktoren der SI der MLC-Antwort noch statistisch signifikant ($P = 0,001$) von 2,89 auf 12,75 zu erhöhen ist. Dies zeigt, dass auch bei haploidentischen Paarungen durch Zugabe von Zytokinen eine deutliche Steigerung der Proliferationsrate erzielt werden kann. Auch gegenüber einem Pool aus fremden Spendern konnte der SI der Proliferationsrate statistisch signifikant ($P = 0,0001$) von 4,56 auf 13,8 erhöht werden. Bei diesen Ergebnissen zeigt sich auch, dass die Proliferationsrate der haploidentischen Kombinationen ohne Verstärkung nur etwa 2/3 der Proliferationsrate der fremden Kombinationen ausmacht, nach Zugabe von Wachstumsfaktoren jedoch auf annähernd gleich hohe Werte gesteigert werden

kann. Dies spricht dafür dass die während der Schwangerschaft induzierte Toleranz, die von van Rood *et al.* (2002) und anderen (Tsafrir *et al.* 2000) beschrieben wird durch Zytokinzugabe aufgehoben werden kann. Es könnte auch eine Erklärung dafür liefern, warum Falkenburg *et al.* (1996) keinen Hinweis auf eine solche Toleranzinduktion finden konnten.

6.5. Untersuchungen an Zellen teilidentisch und identisch transplantierte Patienten

6.5.1. MLC-Verstärkung bei teilidentisch und identisch transplantierten Patienten

Wir wollten überprüfen, ob durch die Verstärkung der MLC mit Wachstumsfaktoren nur eine allgemeine Hochregulierung der MLC-Reaktivität erreicht wird, oder ob die Sensitivität der MLC tatsächlich verbessert werden kann, so dass Aussagen über eine zu erwartende GvHD getroffen werden können. Wir setzten Zellen von Patienten, die HLA-teilidentisch bzw. HLA-identisch transplantiert worden waren und bei denen klinische Daten über das Auftreten einer GvHD vorlagen, mit Zellen der dazugehörigen Spender in einer MLC an. Abb. 22-25 zeigen, dass nur bei denjenigen Patienten, die auch tatsächlich an einer GvHD erkrankten eine Verstärkung des SI der MLC durch Wachstumsfaktoren von 5,24 bzw. 2,12 auf 7,79 bzw. 15,78 zu erzielen war. Dies trifft sowohl für die haploidentisch, als auch für die identisch transplantierten Patienten zu. Umgekehrt konnte bei Zellen von Patienten, die keine GvHD erlitten hatten, auch mit Verstärkung keine Erhöhung der Proliferationsrate in der MLC erreicht werden. Anhand von Tab. 5-8 sieht man, dass bei denjenigen Patienten, die eine GvHD erlitten hatten, bei jeder Paarung eine Reaktivitätserhöhung zu erzielen war. Bei denjenigen Patienten, bei denen keine GvHD aufgetreten war, konnte bei keiner Paarung eine Reaktivitätserhöhung verzeichnet werden. Auf Grund der einerseits großen interindividuellen Streubreite und dem andererseits nur in geringer Menge zur Verfügung stehenden Patientenmaterial sind diese Ergebnisse jedoch nicht statistisch signifikant. Dennoch scheint die Vermutung, dass durch diese Methode eine sensiblere Aussage über

geringere HLA-Differenzen, die zur Entstehung einer GvHD führen können, gemacht werden kann, zuzutreffen. Bei einer Auswahl mehrerer zur Verfügung stehender Spender wäre dies also eine Möglichkeit, den am besten geeigneten Spender zu ermitteln. Des Weiteren wäre es unter Umständen möglich, bei denjenigen Patienten, bei denen in einer verstärkten MLC keine Reaktivitätserhöhung zu erzielen ist, die immunsuppressive Therapie, die eine Beeinträchtigung der Infektabwehr bewirkt und mit dem Auftreten von Sekundärmalignomen assoziiert ist, zu reduzieren ohne dass es zum Auftreten einer GvHD kommt. Auch in Arbeiten von Bishara *et al.* (1994; 1999) konnte eine Korrelation zwischen modifizierten MLCs und der Entwicklung einer GvHD bzw. Transplantatabstoßung nachgewiesen werden.

6.5.2. Separation bei teilidentisch transplantierten Patienten mit GvHD

Mit den Zellen der Spender teilidentisch transplanteder Patienten, die eine GvHD erlitten, führten wir zusätzlich noch eine Separation nach Aktivierung durch. Abb. 26 zeigt, dass auch hier eine Verringerung der HLA-Reaktivität nach Separation von einem SI von 5,24 auf einen SI von 0,67 zu verzeichnen war. Dies lässt Rückschlüsse darauf zu, dass man auch bei Patienten, bei denen auf Grund einer geringen MLC-Reaktivität vor Transplantation ein niedriges Risiko besteht, an einer GvHD zu erkranken, dieses durch eine Separation noch vermindert werden kann. Analog zu unseren Ergebnissen konnten Davies *et al.* (2004) zeigen, dass eine Zellseparation auch bei HLA-identischen Paarungen praktikabel und sinnvoll ist.

In Abb. 27 sieht man, dass bei teilidentisch transplantierten Patienten, die nach Transplantation eine GvHD erlitten, auch nach Separation durch Zugabe von Zytokinen in einer verstärkten MLC eine deutliche Reaktivitätserhöhung von einem SI von 0,67 auf einen SI von 3,37 zu erzielen war. Dies verdeutlicht, dass auch mittels Zellseparation das GvHD-Risiko nur minimiert und nicht ausgeschaltet werden kann. Zudem unterstützt es die bereits getroffene Aussage, dass eine einmalige Zellseparation anhand eines einzigen Oberflächenantigens evtl. nicht ausreichend sein könnte.

Unsere Ergebnissen zeigen, dass sich bei haploidentischen Paarungen, bei denen der Patient eine GvHD erlitt, eine selektive T-Zelldepletion durchführen lässt, die verbleibenden Zellen durch Zugabe von Zytokinen jedoch wieder zu einer stärkeren

Zellproliferation angeregt werden können. Daraus ergibt sich, dass solche Patienten, bei denen auf Grund einer Reaktivitätserhöhung in der verstärkten MLC mit dem Auftreten einer GvHD zu rechnen ist, von der Gabe eines T-Zelldepletierten CD34-positiven Transplantates mit anschließender modifizierter DLI profitieren könnten. Jedoch scheint nur eine leichte Dosiserhöhung der bei DLI gegebenen T-Zellen möglich zu sein, da man auch durch Separation das GvHD-Risiko nur vermindern und nicht gänzlich ausschalten kann.

All diese Untersuchungen an Zellen bereits transplanterter Patienten bedürfen neben einer in vitro Testung mit größeren Fallzahlen auch noch einer klinischen Prüfung. Ob sich unsere Ergebnisse bei größeren Fallzahlen in vitro als statistisch signifikant erweisen und ob sie sich in klinischen Studien als praktikabel erweisen, bleibt abzuwarten.

7. Schlussfolgerungen

Unsere Ergebnisse zeigen, dass sich alloreaktive Zellen in vitro aktivieren und anhand des Aktivierungsmarkers CD69 abtrennen lassen, was zu einer statistisch signifikanten Reduzierung der MLC-Reaktivität führt. Dies zeigte sich sowohl bei fremden, als auch bei teilidentischen Paarungen. Zur Bestimmung der Zellfunktion führten wir einen LTT durch, der keine statistisch signifikante Erniedrigung zeigte. Hieraus lässt sich ableiten, dass es auch in vivo evtl. möglich ist, durch vorherige magnetische Zellseparation alloreaktive Zellen vor DLI abzutrennen und somit höhere Dosen an T-Lymphozyten zu infundieren, ohne das GvHD-Risiko stark zu erhöhen. Damit könnten den Komplikationen wie Transplantatversagen, mangelnde Immunkompetenz und Tumorrezidive, die nach T-zelldepletierten Transplantationen auftreten, unter Umständen entgegengewirkt werden.

Wir konnten zeigen, dass durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren zur MLC eine Erhöhung der Reaktivität zu messen war. Dies fand sich nur bei denjenigen Empfänger/Spender-Paarungen, bei denen der Empfänger tatsächlich an einer GvHD erkrankt war. Dies lässt darauf schließen, dass eine so verstärkte MLC sensitiver in der Aufdeckung minimaler HLA-Differenzen ist.

Damit könnte man bereits vor Transplantation diejenigen Patienten bestimmen, die ein erhöhtes GvHD-Risiko aufweisen. Bei diesen Patienten könnte man dann eine intensivere GvHD-Prophylaxe durchführen, weniger Donorlymphozyten geben, oder eine Abtrennung alloreaktiver Zellen vor DLI durchführen. Zudem wäre beim Vorhandensein mehrerer potentieller Spender auch die Bestimmung des am besten Geeigneten möglich.

All diese Ergebnisse bedürfen jedoch noch einer Überprüfung in klinischen Studien.

8. Literaturverzeichnis

al Daccak, R., Loiseau, P., Rabian, C., Devergie, A., Bourdeau, H., Raffoux, C., Gluckman, E., und Colombani, J. (1990a) HLA-DR, DQ, and/or DP genotypic mismatches between recipient-donor pairs in unrelated bone marrow transplantation and transplant clinical outcome. *Transplantation* **50**, 960-964.

al Daccak, R., Loiseau, P., Soulie, A., Varrin, F., Rabian, C., Raffoux, C., Cohen, D., Degos, L., Gluckman, E., und Colombani, J. (1990b) HLA-DP genotyping in HLA-A,B, and DR identical intrafamilial bone marrow transplantation. *Leukemia* **4**, 222-226.

Amrolia, P. J., Muccioli-Casadei, G., Yvon, E., Huls, H., Sili, U., Wieder, E. D., Bollard, C., Heslop, H. E., Molldrem, J. J., Rooney, C. M., und Brenner, M. K. (2003) Selective depletion of donor alloreactive T cells without loss of antiviral or antileukemic responses. *Blood* **102**, 2292-2299.

Anasetti, C., Amos, D., Beatty, P. G., Appelbaum, F. R., Bensinger, W., Buckner, C. D., Clift, R., Doney, K., Martin, P. J., und Mickelson, E. (1989) Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma. *N Engl J Med* **320**, 197-204.

Andre-Schmutz, I., Le Deist, F., Hacein-Bey-Abina, S., Vitetta, E., Schindler, J., Chedeville, G., Vilmer, E., Fischer, A., und Cavazzana-Calvo, M. (2002) Immune reconstitution without graft-versus-host disease after haemopoietic stem-cell transplantation: a phase 1/2 study. *Lancet* **360**, 130-137.

Armitage, J. O. (1994) Bone marrow transplantation. *N Engl J Med* **330**, 827-838.

Ash, R. C., Casper, J. T., Chitambar, C. R., Hansen, R., Bunin, N., Truitt, R. L., Lawton, C., Murray, K., Hunter, J., und Baxter-Lowe, L. A. (1990) Successful allogeneic transplantation of T-cell-depleted bone marrow from closely HLA-matched unrelated donors. *N Engl J Med* **322**, 485-494.

Atkinson, K., Farrell, C., Chapman, G., Downs, K., Penny, R., und Biggs, J. (1986) Female marrow donors increase the risk of acute graft-versus-host disease: effect of

donor age and parity and analysis of cell subpopulations in the donor marrow inoculum. *Br J Haematol* **63**, 231-239.

Aversa, F., Tabilio, A., Terenzi, A., Velardi, A., Falzetti, F., Giannoni, C., Iacucci, R., Zei, T., Martelli, M. P., und Gambelunghe, C. (1994) Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical "three-loci" incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. *Blood* **84**, 3948-3955.

Bach, F. und Hirschhorn, K. (1964) Lymphocyte Interaction: A Potential Histocompatibility Test In Vitro. *Science* **143**, 813-814.

Bach, F. H. (1976) The major histocompatibility complex and its relationship to allergic disease. *Ann Allergy* **37**, 307-327.

Bacigalupo, A. (2004) Antilymphocyte/thymocyte globulin for graft versus host disease prophylaxis: efficacy and side effects. *Bone Marrow Transplant*.

Bain, B., Vas, M. R., und Lowenstein, L. (1964) The Development Of Large Immature Mononuclear Cells In Mixed Leukocyte Cultures. *Blood* **23**, 108-116.

Barge, R. M., Osanto, S., Marijt, W. A., Starrenburg, C. W., Fibbe, W. E., Nortier, J. W., Falkenburg, J. H., und Willemze, R. (2003) Minimal GVHD following in-vitro T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning allowing subsequent infusions of donor lymphocytes in patients with hematological malignancies and solid tumors. *Exp Hematol* **31**, 865-872.

Barnardo, M. C., Davey, N. J., Bunce, M., Brookes, P. A., Lechler, R. I., Welsh, K. I., und Batchelor, J. R. (1996) A correlation between HLA-C matching and donor antirecipient CTL precursor frequency in bone marrow transplantation. *Transplantation* **61**, 1420-1423.

Barrett, A. J. und Malkovska, V. (1996) Graft-versus-leukaemia: understanding and using the alloimmune response to treat haematological malignancies. *Br J Haematol* **93**, 754-761.

Baughan, A. S., Worsley, A. M., McCarthy, D. M., Hows, J. M., Catovsky, D., Gordon-Smith, E. C., Galton, D. A., und Goldman, J. M. (1984) Haematological reconstitution

and severity of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation for chronic granulocytic leukaemia: the influence of previous splenectomy. *Br J Haematol* **56**, 445-454.

Baxter-Lowe, L. A., Eckels, D. D., Ash, R., Casper, J., Hunter, J. B., und Gorski, J. (1992) The predictive value of HLA-DR oligotyping for MLC responses. *Transplantation* **53**, 1352-1357.

Beatty, P. G., Anasetti, C., Hansen, J. A., Longton, G. M., Sanders, J. E., Martin, P. J., Mickelson, E. M., Choo, S. Y., Petersdorf, E. W., und Pepe, M. S. (1993) Marrow transplantation from unrelated donors for treatment of hematologic malignancies: effect of mismatching for one HLA locus. *Blood* **81**, 249-253.

Beatty, P. G., Hansen, J. A., Longton, G. M., Thomas, E. D., Sanders, J. E., Martin, P. J., Bearman, S. I., Anasetti, C., Petersdorf, E. W., und Mickelson, E. M. (1991) Marrow transplantation from HLA-matched unrelated donors for treatment of hematologic malignancies. *Transplantation* **51**, 443-447.

Begovich, A. B. und Erlich, H. A. (1995) HLA-Typing for bone marrow transplantation. New polymerase chain reaction-based methods. *JAMA* **273**, 586-591.

Bishara, A., Brautbar, C., Cohen, I., und Nagler, A. (1999) Positivity in a modified mixed leukocyte reaction test correlates with molecular HLA-C disparity in prediction of unrelated bone marrow transplantation outcome. *Hum Immunol* **60**, 833-839.

Bishara, A., Brautbar, C., Nagler, A., Slavin, S., Leshem, B., Cohen, I., und Kedar, E. (1994) Prediction by a modified mixed leukocyte reaction assay of graft-versus-host disease and graft rejection after allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* **57**, 1474-1479.

Breur-Vriesendorp, B. S., Vingerhoed, J., Schaasberg, W. P., und Ivanyi, P. (1990) Variations in the T-cell repertoire against HLA antigens in humans. *Hum Immunol* **27**, 1-15.

Breur-Vriesendorp, B. S., Vingerhoed, J., van Twuyver, E., de Waal, L. P., und Ivanyi, P. (1991) Frequency analysis of HLA-specific cytotoxic T-Lymphocyte precursors in humans. *Transplantation* **51**, 1096-1103.

Cavazzana-Calvo, M., Andre-Schmutz, I., Hacein-Bey, S., Schindler, J., Vitetta, H., Dupuis, S., Quartier, P., Chedeville, G., Vilmer, E., Casanova, J. L., Buffet, R., Caillat-Zucman, S., Radford, I., Le Deist, F., und Fischer, A. (2001) [T-cell-depleted HLA non-identical bone marrow transplantation in the child: prevention of graft-versus-host reaction by administration of donor T-Lymphocytes alloreactive against the recipient]. *J Soc Biol* **195**, 65-68.

Cavazzana-Calvo, M., Bordigoni, P., Michel, G., Esperou, H., Souillet, G., Leblanc, T., Stephan, J. L., Vannier, J. P., Mechinaud, F., Reiffers, J., Vilmer, E., Landman-Parker, J., Benkerrou, M., Baruchel, A., Pico, J., Bernaudin, F., Bergeron, C., Plouvier, E., Thomas, C., Wijdenes, J., Lacour, B., Blanche, S., und Fischer, A. (1996) A phase II trial of partially incompatible bone marrow transplantation for high-risk acute lymphoblastic leukaemia in children: prevention of graft rejection with anti-LFA-1 and anti-CD2 antibodies. Societe Francaise de Greffe de Moelle Osseuse. *Br J Haematol* **93**, 131-138.

Cavazzana-Calvo, M., Fromont, C., Le Deist, F., Lusardi, M., Coulombel, L., Derocq, J. M., Gerota, I., Griscelli, C., und Fischer, A. (1990) Specific elimination of alloreactive T cells by an anti-interleukin-2 receptor B chain-specific immunotoxin. *Transplantation* **50**, 1-7.

Chen, B. J., Cui, X., Liu, C., und Chao, N. J. (2002) Prevention of graft-versus-host disease while preserving graft-versus-leukemia effect after selective depletion of host-reactive T cells by photodynamic cell purging process. *Blood* **99**, 3083-3088.

Clausen, J., Vergeiner, B., Enk, M., Petzer, A. L., Gastl, G., und Gunsilius, E. (2003) Functional significance of the activation-associated receptors CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells. *Immunobiology* **207**, 85-93.

Clift, R. A., Buckner, C. D., Appelbaum, F. R., Bearman, S. I., Petersen, F. B., Fisher, L. D., Anasetti, C., Beatty, P., Bensinger, W. I., und Doney, K. (1990) Allogeneic marrow transplantation in patients with acute myeloid leukemia in first remission: a randomized trial of two irradiation regimens. *Blood* **76**, 1867-1871.

Corson, S. L., Sullivan, K., Batzer, F., August, C., Storb, R., und Thomas, E. D. (1982) Gynecologic manifestations of chronic graft-versus-host disease. *Obstet Gynecol* **60**, 488-492.

Dausset, J. (1954) [Presence of A & B antigens in leukocytes disclosed by agglutination tests.]. *C R Seances Soc Biol Fil* **148**, 1607-1608.

Davies, J. K., Koh, M. B., und Lowdell, M. W. (2004) Antiviral immunity and T-regulatory cell function are retained after selective alloreactive T-cell depletion in both the HLA-identical and HLA-mismatched settings. *Biol Blood Marrow Transplant* **10**, 259-268.

Deeg, H. J., Loughran, T. P., Jr., Storb, R., Kennedy, M. S., Sullivan, K. M., Doney, K., Appelbaum, F. R., und Thomas, E. D. (1985) Treatment of human acute graft-versus-host disease with antithymocyte globulin and cyclosporine with or without methylprednisolone. *Transplantation* **40**, 162-166.

DeGast, G. C., Mickelson, E. M., Beatty, P. G., Amos, D., Sullivan, K. M., Schoch, H. G., Thomas, E. D., und Hansen, J. A. (1992) Mixed leukocyte culture reactivity and graft-versus-host disease in HLA-identical marrow transplantation for leukemia. *Bone Marrow Transplant* **9**, 87-90.

Depil, S., Deconinck, E., Milpied, N., Sutton, L., Witz, F., Jouet, J. P., Damaj, G., und Yakoub-Agha, I. (2004) Donor lymphocyte infusion to treat relapse after allogeneic bone marrow transplantation for myelodysplastic syndrome. *Bone Marrow Transplant* **33**, 531-534.

Dickinson, A. M., Sviland, L., Hamilton, P. J., Usher, P., Taylor, P., Jackson, G., Dunn, J., und Proctor, S. J. (1994) Cytokine involvement in predicting clinical graft-versus-host disease in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* **13**, 65-70.

Dickinson, A. M., Sviland, L., Wang, X. N., Jackson, G., Taylor, P. R., Dunn, A., und Proctor, S. J. (1998) Predicting graft-versus-host disease in HLA-identical bone marrow transplant: a comparison of T-cell frequency analysis and a human skin explant model. *Transplantation* **66**, 857-863.

Dupont, B. und Good, R. A. (1975) Lymphocyte transformation in vitro in patients with immunodeficiency diseases: use in diagnosis, histocompatibility testing and monitoring treatment. *Birth Defects Orig Artic Ser* **11**, 477-485.

Edinger, M., Hoffmann, P., Ermann, J., Drago, K., Fathman, C. G., Strober, S., und Negrin, R. S. (2003) CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* **9**, 1144-1150.

Eisenthal, A., Hassner, A., Shenav, M., Baron, S., und Lifschitz-Mercer, B. (2003) Phenotype and function of lymphocytes from the neonatal umbilical cord compared to paired maternal peripheral blood cells isolated during delivery. *Exp Mol Pathol* **75**, 45-52.

Falkenburg, J. H., Luxemburg-Heijs, S. A., Lim, F. T., Kanhai, H. H., und Willemze, R. (1996) Umbilical cord blood contains normal frequencies of cytotoxic T-Lymphocyte precursors (ctlp) and helper T-Lymphocyte precursors against noninherited maternal antigens and noninherited paternal antigens. *Ann Hematol* **72**, 260-264.

Falkenburg, J. H., Wafelman, A. R., Joosten, P., Smit, W. M., van Bergen, C. A., Bongaerts, R., Lurvink, E., van der, H. M., Kluck, P., Landegent, J. E., Kluin-Nelemans, H. C., Fibbe, W. E., und Willemze, R. (1999) Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia-reactive cytotoxic T-Lymphocytes. *Blood* **94**, 1201-1208.

Fefer, A., Mickelson, E., und Thomas, E. D. (1974) Leukaemia antigens: mixed leucocyte culture tests on twelve leukaemic patients with identical twins. *Clin Exp Immunol* **18**, 237-242.

Fehse, B., Frerk, O., Goldmann, M., Bulduk, M., und Zander, A. R. (2000a) Efficient depletion of alloreactive donor T-Lymphocytes based on expression of two activation-induced antigens (CD25 and CD69). *Br J Haematol* **109**, 644-651.

Fehse, B., Goldmann, M., Frerk, O., Bulduk, M., und Zander, A. R. (2000b) Depletion of alloreactive donor T cells using immunomagnetic cell selection. *Bone Marrow Transplant* **25 Suppl 2**, S39-S42.

Feig, S. A., Opelz, G., Winter, H. S., Falk, P. M., Neerhout, R. C., Sparkes, R., und Gale, R. P. (1976) Successful bone marrow transplantation against mixed lymphocyte culture barrier. *Blood* **48**, 385-391.

Fischer, A., Landais, P., Friedrich, W., Gerritsen, B., Fasth, A., Porta, F., Vellodi, A., Benkerrou, M., Jais, J. P., und Cavazzana-Calvo, M. (1994) Bone marrow transplantation (BMT) in Europe for primary immunodeficiencies other than severe combined immunodeficiency: a report from the European Group for BMT and the European Group for Immunodeficiency. *Blood* **83**, 1149-1154.

Fridman, W. H. und Kourilsky, F. M. (1969) Stimulation of lymphocytes by autologous leukaemic cells in acute leukaemia. *Nature* **224**, 277-279.

Fussell, S. T., Donnellan, M., Cooley, M. A., und Farrell, C. (1994) Cytotoxic T-Lymphocyte precursor frequency does not correlate with either the incidence or severity of graft-versus-host disease after matched unrelated donor bone marrow transplantation. *Transplantation* **57**, 673-676.

Gale, R. P., Bortin, M. M., van Bekkum, D. W., Biggs, J. C., Dicke, K. A., Gluckman, E., Good, R. A., Hoffmann, R. G., Kay, H. E., und Kersey, J. H. (1987) Risk factors for acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol* **67**, 397-406.

Gluckman, E., Barrett, A. J., Arcese, W., Devergie, A., und Degoulet, P. (1981) Bone marrow transplantation in severe aplastic anaemia: a survey of the European Group for Bone Marrow Transplantation (E.G.B.M.T.). *Br J Haematol* **49**, 165-173.

Glucksberg, H., Storb, R., Fefer, A., Buckner, C. D., Neiman, P. E., Clift, R. A., Lerner, K. G., und Thomas, E. D. (1974) Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* **18**, 295-304.

Godfrey, W. R., Krampf, M. R., Taylor, P. A., und Blazar, B. R. (2004) Ex vivo depletion of alloreactive cells based on CFSE dye dilution, activation antigen selection, and dendritic cell stimulation. *Blood* **103**, 1158-1165.

Goldman, J. M., Gale, R. P., Horowitz, M. M., Biggs, J. C., Champlin, R. E., Gluckman, E., Hoffmann, R. G., Jacobsen, S. J., Marmont, A. M., McGlave, P. B., und . (1988) Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in

chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion. *Ann Intern Med* **108**, 806-814.

Gomez-Garcia, P., Herrera-Arroyo, C., Torres-Gomez, A., Gomez-Carrasco, J., Aljama-Garcia, P., Lopez-Rubio, F., Martinez-Guibelalde, F., Fornes-Torres, G., und Rojas-Contreras, R. (1988) Renal involvement in chronic graft-versus-host disease: a report of two cases. *Bone Marrow Transplant* **3**, 357-362.

Gribben, J. G., Guinan, E. C., Boussiotis, V. A., Ke, X. Y., Linsley, L., Sieff, C., Gray, G. S., Freeman, G. J., und Nadler, L. M. (1996) Complete blockade of B7 family-mediated costimulation is necessary to induce human alloantigen-specific anergy: a method to ameliorate graft-versus-host disease and extend the donor pool. *Blood* **87**, 4887-4893.

Groth, C. G., Gahrton, G., Lundgren, G., Moller, E., Pihlstedt, P., Ringden, O., und Sundelin, P. (1979) Successful treatment with prednisone and graft-versus-host disease in an allogeneic bone-marrow transplant recipient. *Scand J Haematol* **22**, 333-338.

Gutterman, J. U., Mavligit, G., McCredie, K. B., Bodey, G. P., Sr., Freireich, E. J., und Hersh, E. M. (1972) Antigen solubilized from human leukemia: lymphocyte stimulation. *Science* **177**, 1114-1115.

Gutterman, J. U., Mavligit, G., McCredie, K. B., Freireich, E. J., und Hersh, E. M. (1973) Auto-immunization with acute leukemia cells: demonstration of increased lymphocyte responsiveness. *Int J Cancer* **11**, 521-526.

Handgretinger, R., Klingebiel, T., Lang, P., Gordon, P., und Niethammer, D. (2003) Megadose transplantation of highly purified haploidentical stem cells: current results and future prospects. *Pediatr Transplant* **7 Suppl 3**, 51-55.

Henslee-Downey, P. J., Abhyankar, S. H., Parrish, R. S., Pati, A. R., Godder, K. T., Neglia, W. J., Goon-Johnson, K. S., Geier, S. S., Lee, C. G., und Gee, A. P. (1997) Use of partially mismatched related donors extends access to allogeneic marrow transplant. *Blood* **89**, 3864-3872.

Herve, P., Racadot, E., Wijdenes, J., Flesch, M., Tiberghien, P., Bordigoni, P., Holler, E., Powles, M., Bourdeau, M., und Wilmer, E. (1991) Monoclonal anti TNF alpha

antibody in the treatment of acute GvHD refractory both to corticosteroids and anti IL-2 R antibody. *Bone Marrow Transplant* **7 Suppl 2**, 149.

Hessner, M. J., Endean, D. J., Casper, J. T., Horowitz, M. M., Keever-Taylor, C. A., Roth, M., Flomenberg, N., und Drobyski, W. R. (1995) Use of unrelated marrow grafts compensates for reduced graft-versus-leukemia reactivity after T-cell-depleted allogeneic marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia
1. *Blood* **86**, 3987-3996.

Hill, G. R., Crawford, J. M., Cooke, K. R., Brinson, Y. S., Pan, L., und Ferrara, J. L. (1997) Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood* **90**, 3204-3213.

Hill, G. R., Teshima, T., Rebel, V. I., Krijanovski, O. I., Cooke, K. R., Brinson, Y. S., und Ferrara, J. L. (2000) The p55 TNF-alpha receptor plays a critical role in T cell alloreactivity. *J Immunol* **164**, 656-663.

Horowitz, M. M., Gale, R. P., Sondel, P. M., Goldman, J. M., Kersey, J., Kolb, H. J., Rimm, A. A., Ringden, O., Rozman, C., und Speck, B. (1990) Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* **75**, 555-562.

Hymes, S. R., Morison, W. L., Farmer, E. R., Walters, L. L., Tutschka, P. J., und Santos, G. W. (1985) Methoxsalen and ultraviolet A radiation in treatment of chronic cutaneous graft-versus-host reaction. *J Am Acad Dermatol* **12**, 30-37.

Jabado, N., Le Deist, F., Cant, A., Graeff-Meeder, E. R., Fasth, A., Morgan, G., Vellodi, A., Hale, G., Bujan, W., Thomas, C., Cavazzana-Calvo, M., Wijdenes, J., und Fischer, A. (1996) Bone marrow transplantation from genetically HLA-nonidentical donors in children with fatal inherited disorders excluding severe combined immunodeficiencies: use of two monoclonal antibodies to prevent graft rejection. *Pediatrics* **98**, 420-428.

Janeway Ch.A., Travers P., Walport M., und Sholmchik M. (2002) *Immunologie*.

Kaminski, E., Hows, J., Man, S., Brookes, P., Mackinnon, S., Hughes, T., Avakian, O., Goldman, J. M., und Batchelor, J. R. (1989) Prediction of graft versus host disease by frequency analysis of cytotoxic T cells after unrelated donor bone marrow transplantation. *Transplantation* **48**, 608-613.

Kaminski, E., Sharrock, C., Hows, J., Ritter, M., Arthur, C., McKinnon, S., und Batchelor, J. R. (1988) Frequency analysis of cytotoxic T-Lymphocyte precursors--possible relevance to HLA-matched unrelated donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* **3**, 149-155.

Kaminski, E. R. (1989) How important is histocompatibility in bone marrow transplantation? *Bone Marrow Transplant* **4**, 439-444.

Keever-Taylor, C. A., Passweg, J., Kawanishi, Y., Casper, J., Flomenberg, N., und Baxter-Lowe, L. A. (1997) Association of donor-derived host-reactive cytolytic and helper T cells with outcome following alternative donor T cell-depleted bone marrow transplantation

1. *Bone Marrow Transplant* **19**, 1001-1009.

Kernan, N. A., Bartsch, G., Ash, R. C., Beatty, P. G., Champlin, R., Filipovich, A., Gajewski, J., Hansen, J. A., Henslee-Downey, J., und McCullough, J. (1993) Analysis of 462 transplantations from unrelated donors facilitated by the National Marrow Donor Program. *N Engl J Med* **328**, 593-602.

Klingebiel, T., Handgretinger, R., Lang, P., Bader, P., und Niethammer, D. (2004) Haploidentical transplantation for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Blood Rev* **18**, 181-192.

Knobloch, C., Goldmann, S. F., und Friedrich, W. (1991) Self-nonsel self discrimination and repertoire selection of human T cells differentiated in an HLA-semiallogeneic environment following bone marrow transplantation for severe combined immunodeficiency. *Eur J Immunol* **21**, 2479-2487.

Koh, M. B., Prentice, H. G., Corbo, M., Morgan, M., Cotter, F. E., und Lowdell, M. W. (2002) Alloantigen-specific T-cell depletion in a major histocompatibility complex fully mismatched murine model provides effective graft-versus-host disease prophylaxis in the presence of lymphoid engraftment. *Br J Haematol* **118**, 108-116.

Koh, M. B., Prentice, H. G., und Lowdell, M. W. (1999) Selective removal of alloreactive cells from haematopoietic stem cell grafts: graft engineering for GVHD prophylaxis. *Bone Marrow Transplant* **23**, 1071-1079.

Kolb, H. J., Schattenberg, A., Goldman, J. M., Hertenstein, B., Jacobsen, N., Arcese, W., Ljungman, P., Ferrant, A., Verdonck, L., und Niederwieser, D. (1995) Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia. *Blood* **86**, 2041-2050.

Kolb, H. J., Schmid, C., Weisser, M., Pihusch, M., Tischer, J., Pihusch, R., Stoetzer, O., Ledderose, G., und Schleuning, M. (2002) Cyto reduction, DLI, or mobilized peripheral blood progenitors. *Ann Hematol* **81 Suppl 2**, S30-S33.

Korngold, R. und Sprent, J. (1980) Negative selection of T cells causing lethal graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers. Role of the H-2 complex. *J Exp Med* **151**, 1114-1124.

Kreitman, R. J., Bailon, P., Chaudhary, V. K., FitzGerald, D. J., und Pastan, I. (1994) Recombinant immunotoxins containing anti-Tac(Fv) and derivatives of Pseudomonas exotoxin produce complete regression in mice of an interleukin-2 receptor-expressing human carcinoma. *Blood* **83**, 426-434.

Li, B., New, J. Y., Tay, Y. K., Goh, E., Yap, E. H., Chan, S. H., und Hu, H. Z. (2004) Delaying acute graft-versus-host disease in mouse bone marrow transplantation by treating donor cells with antibodies directed at I-selectin and alpha4-integrin prior to infusion. *Scand J Immunol* **59**, 464-468.

Lonnqvist, B., Aschan, J., Ljungman, P., und Ringden, O. (1990) Long-term cyclosporin therapy may decrease the risk of chronic graft-versus-host disease. *Br J Haematol* **74**, 547-548.

Mackinnon, S., Papadopoulos, E. B., Carabasi, M. H., Reich, L., Collins, N. H., Boulad, F., Castro-Malaspina, H., Childs, B. H., Gillio, A. P., und Kernan, N. A. (1995) Adoptive immunotherapy evaluating escalating doses of donor leukocytes for relapse of chronic myeloid leukemia after bone marrow transplantation: separation of graft-versus-leukemia responses from graft-versus-host disease. *Blood* **86**, 1261-1268.

Marks, D. I., Cullis, J. O., Ward, K. N., Lacey, S., Syzdlo, R., Hughes, T. P., Schwarzer, A. P., Lutz, E., Barrett, A. J., und Hows, J. M. (1993) Allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia using sibling and volunteer

unrelated donors. A comparison of complications in the first 2 years. *Ann Intern Med* **119**, 207-214.

Marks, D. I., Lush, R., Cavenagh, J., Milligan, D. W., Schey, S., Parker, A., Clark, F. J., Hunt, L., Yin, J., Fuller, S., Vandenberghe, E., Marsh, J., Littlewood, T., Smith, G. M., Culligan, D., Hunter, A., Chopra, R., Davies, A., Towilson, K., und Williams, C. D. (2002) The toxicity and efficacy of donor lymphocyte infusions given after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Blood* **100**, 3108-3114.

Marmont, A. M., Horowitz, M. M., Gale, R. P., Sobocinski, K., Ash, R. C., van Bekkum, D. W., Champlin, R. E., Dicke, K. A., Goldman, J. M., und Good, R. A. (1991) T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood* **78**, 2120-2130.

Mavroudis, D. A., Dermime, S., Molldrem, J., Jiang, Y. Z., Raptis, A., van Rhee, F., Hensel, N., Fellowes, V., Eliopoulos, G., und Barrett, A. J. (1998) Specific depletion of alloreactive T cells in HLA-identical siblings: a method for separating graft-versus-host and graft-versus-leukaemia reactions

1. *Br J Haematol* **101**, 565-570.

Mavroudis, D. A., Jiang, Y. Z., Hensel, N., Lewalle, P., Couriel, D., Kreitman, R. J., Pastan, I., und Barrett, A. J. (1996) Specific depletion of alloreactivity against haplotype mismatched related individuals by a recombinant immunotoxin: a new approach to graft-versus-host disease prophylaxis in haploidentical bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* **17**, 793-799.

McGlave, P., Bartsch, G., Anasetti, C., Ash, R., Beatty, P., Gajewski, J., und Kernan, N. A. (1993) Unrelated donor marrow transplantation therapy for chronic myelogenous leukemia: initial experience of the National Marrow Donor Program. *Blood* **81**, 543-550.

McGlave, P., Scott, E., Ramsay, N., Arthur, D., Blazar, B., McCullough, J., und Kersey, J. (1987) Unrelated donor bone marrow transplantation therapy for chronic myelogenous leukemia. *Blood* **70**, 877-881.

Michalek, J., Collins, R. H., und Vitetta, E. S. (2003) Clinical-scale selective depletion of alloreactive T cells using an anti-CD25 immunotoxin. *Neoplasia* **50**, 296-299.

Mickelson, E. M., Bartsch, G. E., Hansen, J. A., und Dupont, B. (1993) The MLC assay as a test for HLA-D region compatibility between patients and unrelated donors: results of a national marrow donor program involving multiple centers. *Tissue Antigens* **42**, 465-472.

Mickelson, E. M., Guthrie, L. A., Etzioni, R., Anasetti, C., Martin, P. J., und Hansen, J. A. (1994) Role of the mixed lymphocyte culture (MLC) reaction in marrow donor selection: matching for transplants from related haploidentical donors. *Tissue Antigens* **44**, 83-92.

Mickelson, E. M., Longton, G., Anasetti, C., Petersdorf, E., Martin, P., Guthrie, L. A., und Hansen, J. A. (1996) Evaluation of the mixed lymphocyte culture (MLC) assay as a method for selecting unrelated donors for marrow transplantation. *Tissue Antigens* **47**, 27-36.

Montagna, D., Yvon, E., Calcaterra, V., Comoli, P., Locatelli, F., Maccario, R., Fisher, A., und Cavazzana-Calvo, M. (1999) Depletion of alloreactive T cells by a specific anti-interleukin-2 receptor p55 chain immunotoxin does not impair in vitro antileukemia and antiviral activity. *Blood* **93**, 3550-3557.

Nestel, F. P., Greene, R. N., Kichian, K., Ponka, P., und Lapp, W. S. (2000) Activation of macrophage cytostatic effector mechanisms during acute graft-versus-host disease: release of intracellular iron and nitric oxide-mediated cytostasis. *Blood* **96**, 1836-1843.

O'Reilly, R. J., Keever, C. A., Small, T. N., und Brochstein, J. (1989) The use of HLA-non-identical T-cell-depleted marrow transplants for correction of severe combined immunodeficiency disease. *Immunodef Rev* **1**, 273-309.

Ollier, W., Mendell, N., Sachs, J., Jaraquemada, D., Evans, S., Pegrum, G., und Festenstein, H. (1981) Sources of variance in the double normalized value: an evaluation of its reproducibility as a measure on HLA-D locus identity. *Tissue Antigens* **18**, 141-153.

Pawelec, G., Ehninger, G., Schmidt, H., und Wernet, P. (1986) HLA-DP matching and graft-versus-host disease in allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* **42**, 558-560.

Ralph, D. D., Springmeyer, S. C., Sullivan, K. M., Hackman, R. C., Storb, R., und Thomas, E. D. (1984) Rapidly progressive air-flow obstruction in marrow transplant recipients. Possible association between obliterative bronchiolitis and chronic graft-versus-host disease. *Am Rev Respir Dis* **129**, 641-644.

Rettinger, E., Scumm, M., Lang, P., Greil, J., Pfeiffer, M., Handgretinger, R., und Niethammer, D. Generation, Identification and Depletion of allo-reactive t-cells for adoptive immunotherapy after haploidentical transplantation. EBMT 2001 / 27th Annual Meeting and 17th Meeting of the Nurses Group, March 25-28, 2001, Maastricht, The Netherlands . 2004.

Reusser, P., Attenhofer, R., Hebart, H., Helg, C., Chapuis, B., und Einsele, H. (1997) Cytomegalovirus-specific T-cell immunity in recipients of autologous peripheral blood stem cell or bone marrow transplants. *Blood* **89**, 3873-3879.

Reyes, M. G., Noronha, P., Thomas, W., Jr., und Heredia, R. (1983) Myositis of chronic graft versus host disease. *Neurology* **33**, 1222-1224.

Riddell, S. R. und Greenberg, P. D. (1997) T cell therapy of human CMV and EBV infection in immunocompromised hosts. *Rev Med Virol* **7**, 181-192.

Riddell, S. R., Reusser, P., und Greenberg, P. D. (1991) Cytotoxic T cells specific for cytomegalovirus: a potential therapy for immunocompromised patients. *Rev Infect Dis* **13 Suppl 11**, S966-S973.

Ringden, O. (1986) Cyclosporine in allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* **42**, 445-452.

Ringden, O. und Nilsson, B. (1985) Death by graft-versus-host disease associated with HLA mismatch, high recipient age, low marrow cell dose, and splenectomy. *Transplantation* **40**, 39-44.

Ringden, O., Paulin, T., Lonnqvist, B., und Nilsson, B. (1985) An analysis of factors predisposing to chronic graft-versus-host disease. *Exp Hematol* **13**, 1062-1067.

Ringden, O., Sundberg, B., Lonnqvist, B., Tollemar, J., Gahrton, G., und Nilsson, B. (1988) Allogeneic bone marrow transplantation for leukemia: factors of importance for long-term survival and relapse. *Bone Marrow Transplant* **3**, 281-290.

Roca, J., Granena, A., Rodriguez-Roisin, R., Alvarez, P., Agusti-Vidal, A., und Rozman, C. (1982) Fatal airway disease in an adult with chronic graft-versus-host disease. *Thorax* **37**, 77-78.

Rooney, C. M., Aguilar, L. K., Huls, M. H., Brenner, M. K., und Heslop, H. E. (2001) Adoptive immunotherapy of EBV-associated malignancies with EBV-specific cytotoxic T-cell lines. *Curr Top Microbiol Immunol* **258**, 221-229.

Roosnek, E., Hogendijk, S., Zawadynski, S., Speiser, D., Tiercy, J. M., Helg, C., Chapuis, B., Gratwohl, A., Gmur, J., und Seger, R. (1993) The frequency of pretransplant donor cytotoxic T cell precursors with anti-host specificity predicts survival of patients transplanted with bone marrow from donors other than HLA-identical siblings. *Transplantation* **56**, 691-696.

Ruutu, T., Ruutu, M., Volin, L., und Leskinen, R. (1988) Severe cystitis as a manifestation of chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Br J Urol* **62**, 612-613.

Sale, G. E., Lerner, K. G., Barker, E. A., Shulman, H. M., und Thomas, E. D. (1977) The skin biopsy in the diagnosis of acute graft-versus-host disease in man. *Am J Pathol* **89**, 621-635.

Santamaria, P., Reinsmoen, N. L., Lindstrom, A. L., Boyce-Jacino, M. T., Barbosa, J. J., Faras, A. J., McGlave, P. B., und Rich, S. S. (1994) Frequent HLA class I and DP sequence mismatches in serologically (HLA-A, HLA-B, HLA-DR) and molecularly (HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1) HLA-identical unrelated bone marrow transplant pairs. *Blood* **83**, 280-287.

Schwarer, A. P., Jiang, Y. Z., Deacock, S., Brookes, P. A., Barrett, A. J., Goldman, J. M., Batchelor, J. R., und Lechler, R. I. (1994) Comparison of helper and cytotoxic antirecipient T cell frequencies in unrelated bone marrow transplantation. *Transplantation* **58**, 1198-1203.

Shlomchik, W. D., Couzens, M. S., Tang, C. B., McNiff, J., Robert, M. E., Liu, J., Shlomchik, M. J., und Emerson, S. G. (1999) Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* **285**, 412-415.

Shulman, H. M., Sullivan, K. M., Weiden, P. L., McDonald, G. B., Striker, G. E., Sale, G. E., Hackman, R., Tsoi, M. S., Storb, R., und Thomas, E. D. (1980) Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med* **69**, 204-217.

Slavin, S., Morecki, S., Weiss, L., und Or, R. (2002) Donor lymphocyte infusion: the use of alloreactive and tumor-reactive lymphocytes for immunotherapy of malignant and nonmalignant diseases in conjunction with allogeneic stem cell transplantation. *J Hematother Stem Cell Res* **11**, 265-276.

Smith, C. I., Aarli, J. A., Biberfeld, P., Bolme, P., Christensson, B., Gahrton, G., Hammarstrom, L., Lefvert, A. K., Lonnqvist, B., und Matell, G. (1983) Myasthenia gravis after bone-marrow transplantation. Evidence for a donor origin. *N Engl J Med* **309**, 1565-1568.

Socie, G., Devergie, A., Cosset, J. M., Pierga, J. Y., Esperou, H., Girinski, T., und Gluckman, E. (1990) Low-dose (one gray) total-lymphoid irradiation for extensive, drug-resistant chronic graft-versus-host disease. *Transplantation* **49**, 657-658.

Soiffer, R. J., Murray, C., Mauch, P., Anderson, K. C., Freedman, A. S., Rabinowe, S. N., Takvorian, T., Robertson, M. J., Spector, N., und Gonin, R. (1992) Prevention of graft-versus-host disease by selective depletion of CD6-positive T-Lymphocytes from donor bone marrow. *J Clin Oncol* **10**, 1191-1200.

Speiser, D. E., Loliger, C. C., Siren, M. K., und Jeannet, M. (1996) Pretransplant cytotoxic donor T-cell activity specific to patient HLA class I antigens correlating with mortality after unrelated BMT

1. *Br J Haematol* **93**, 935-939.

Spencer, A., Brookes, P. A., Kaminski, E., Hows, J. M., Szydlo, R. M., van Rhee, F., Goldman, J. M., und Batchelor, J. R. (1995a) Cytotoxic T-Lymphocyte precursor frequency analyses in bone marrow transplantation with volunteer unrelated donors. Value in donor selection. *Transplantation* **59**, 1302-1308.

Spencer, A., Szydlo, R. M., Brookes, P. A., Kaminski, E., Rule, S., van Rhee, F., Ward, K. N., Hale, G., Waldmann, H., und Hows, J. M. (1995b) Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia with volunteer unrelated donors using ex

vivo or in vivo T-cell depletion: major prognostic impact of HLA class I identity between donor and recipient. *Blood* **86**, 3590-3597.

Sprent, J., Schaefer, M., Gao, E. K., und Korngold, R. (1988) Role of T cell subsets in lethal graft-versus-host disease (GVHD) directed to class I versus class II H-2 differences. I. L3T4+ cells can either augment or retard GVHD elicited by Lyt-2+ cells in class I different hosts. *J Exp Med* **167**, 556-569.

Storb, R., Deeg, H. J., Whitehead, J., Appelbaum, F., Beatty, P., Bensinger, W., Buckner, C. D., Clift, R., Doney, K., und Farewell, V. (1986) Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *N Engl J Med* **314**, 729-735.

Storb, R., Prentice, R. L., und Thomas, E. D. (1977) Treatment of aplastic anemia by marrow transplantation from HLA identical siblings. Prognostic factors associated with graft versus host disease and survival. *J Clin Invest* **59**, 625-632.

Storb, R. und Thomas, E. D. (1983) Allogeneic bone-marrow transplantation. *Immunol Rev* **71**, 77-102.

Sullivan, K. M., Shulman, H. M., Storb, R., Weiden, P. L., Witherspoon, R. P., McDonald, G. B., Schubert, M. M., Atkinson, K., und Thomas, E. D. (1981) Chronic graft-versus-host disease in 52 patients: adverse natural course and successful treatment with combination immunosuppression. *Blood* **57**, 267-276.

Sullivan, K. M., Witherspoon, R. P., Storb, R., Weiden, P., Flournoy, N., Dahlberg, S., Deeg, H. J., Sanders, J. E., Doney, K. C., und Appelbaum, F. R. (1988) Prednisone and azathioprine compared with prednisone and placebo for treatment of chronic graft-v-host disease: prognostic influence of prolonged thrombocytopenia after allogeneic marrow transplantation. *Blood* **72**, 546-554.

Tanaka, J., Imamura, M., Kasai, M., und Sakurada, K. (1995) Transplantation-related complications predicted by cytokine gene expression in the mixed lymphocyte culture in allogeneic bone marrow transplants. *Leuk Lymphoma* **19**, 27-32.

Thomas, E. D., Clift, R. A., Fefer, A., Appelbaum, F. R., Beatty, P., Bensinger, W. I., Buckner, C. D., Cheever, M. A., Deeg, H. J., und Doney, K. (1986) Marrow

transplantation for the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Ann Intern Med* **104**, 155-163.

Truitt, R. L. und Johnson, B. D. (1995) Principles of graft-vs.-leukemia reactivity. *Biol Blood Marrow Transplant* **1**, 61-68.

Tsafir, A., Brautbar, C., Nagler, A., Elchalal, U., Miller, K., und Bishara, A. (2000) Alloreactivity of umbilical cord blood mononuclear cells: specific hyporesponse to noninherited maternal antigens. *Hum Immunol* **61**, 548-554.

Valteau-Couanet, D., Cavazzana-Calvo, M., und Fischer, A. (1992) [Residual lymphocytes after specific depletion. Functional study]. *Presse Med* **21**, 1939-1940.

van Bekkum, D. W. und Knaan, S. (1977) Role of bacterial microflora in development of intestinal lesions from graft-versus-host reaction. *J Natl Cancer Inst* **58**, 787-790.

van der Straaten, H. M., Fijnheer, R., Dekker, A. W., Nieuwenhuis, H. K., and Verdonck, L. F. (2001) Relationship between graft-versus-host disease and graft-versus-leukaemia in partial T cell-depleted bone marrow transplantation. *Br J Haematol* **114**, 31-35.

van der, M. A., Allebes, W. A., Voorter, C. E., van den Berg-Loonen EM, Schattenberg, A. V., de Witte, T. J., und Joosten, I. (1998) Helper and cytotoxic T cell precursor frequencies are not predictive for development of acute graft-versus-host disease after partially T cell-depleted HLA-identical sibling BMT. *Bone Marrow Transplant* **22**, 1049-1055.

van Dijk, A. M., Kessler, F. L., Stadhouders-Keet, S. A., Verdonck, L. F., de Gast, G. C., und Otten, H. G. (1999) Selective depletion of major and minor histocompatibility antigen reactive T cells: towards prevention of acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol* **107**, 169-175.

van Dijk, A. M., Kessler, F. L., Verdonck, L. F., Stadhouders-Keet, S. A., van Lier, R. A., de Gast, G. C., und Otten, H. G. (2000) Primary human keratinocytes as targets in predicting acute graft-versus-host disease following HLA-identical bone marrow transplantation 1. *Br J Haematol* **111**, 791-796.

van Rood, J. J. (1994) Immunogenetics. *Curr Opin Hematol* **1**, 429-434.

van Rood, J. J., Loberiza, F. R., Jr., Zhang, M. J., Oudshoorn, M., Claas, F., Cairo, M. S., Champlin, R. E., Gale, R. P., Ringden, O., Hows, J. M., und Horowitz, M. H. (2002) Effect of tolerance to noninherited maternal antigens on the occurrence of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation from a parent or an HLA-haploidentical sibling. *Blood* **99**, 1572-1577.

Vela-Ojeda, J., Garcia-Ruiz Esparza, M. A., Reyes-Maldonado, E., Jimenez-Zamudio, L., Moreno-Lafont, M., Garcia-Latorre, E., Ramirez-Sanjuan, E., Montiel-Cervantes, L., Tripp-Villanueva, F., Garcia-Leon, L. D., Ayala-Sanchez, M., Rosas-Cabral, A., Avina-Zubieta, J. A., Galindo-Rodriguez, G., Vadillo-Buenfil, M., und Salazar-Exaire, D. (2004) Donor lymphocyte infusions for relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic stem cell transplantation: prognostic significance of the dose of CD3(+) and CD4(+) lymphocytes. *Ann Hematol* **83**, 295-301.

Vogelsang, G. B., Santos, G. W., Colvin, O. M., und Chen, T. (1988) Thalidomide for graft-versus-host disease. *Lancet* **1**, 827.

Walter, E. A., Greenberg, P. D., Gilbert, M. J., Finch, R. J., Watanabe, K. S., Thomas, E. D., und Riddell, S. R. (1995) Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med* **333**, 1038-1044.

Weiden, P. L., Doney, K., Storb, R., und Thomas, E. D. (1978) Anti-human thymocyte globulin (ATG) for prophylaxis and treatment of graft-versus-host disease in recipients of allogeneic marrow grafts. *Transplant Proc* **10**, 213-216.

Weiden, P. L., Flournoy, N., Thomas, E. D., Prentice, R., Fefer, A., Buckner, C. D., und Storb, R. (1979) Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med* **300**, 1068-1073.

Wingard, J. R., Piantadosi, S., Vogelsang, G. B., Farmer, E. R., Jabs, D. A., Levin, L. S., Beschorner, W. E., Cahill, R. A., Miller, D. F., und Harrison, D. (1989) Predictors of death from chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Blood* **74**, 1428-1435.

Wyatt, S. E., Nunn, P., Hows, J. M., Yin, J., Hayes, M. C., Catovsky, D., Gordon-Smith, E. C., Hughes, J. M., Goldman, J. M., und Galton, D. (1984) Airways

obstruction associated with graft versus host disease after bone marrow transplantation. *Thorax* **39**, 887-894.

Xun, C. Q., Thompson, J. S., Jennings, C. D., Brown, S. A., und Widmer, M. B. (1994) Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice. *Blood* **83**, 2360-2367.

9. Anhang

Lebenslauf:

Name: Ursula Marietta Schrey, geborene Leonhardt
Wohnort: Hans-Thoma-Platz 42, 69121 Heidelberg
Geburtsdatum: 03. Mai 1976
Geburtsort: München
Familienstand: verheiratet
Nationalität: deutsch
Religion: evangelisch

Schulbildung:

1982 – 1986 Grundschule Holzkirchen
1986 – 1995 Gymnasium Bad Aibling
30.06.1995 Abitur

Studium:

10/1995 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
09/1997 Ärztliche Vorprüfung, Note „gut“ (1,66)
09/1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note „gut“ (2,0)
09/2000 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note „gut“ (1,66)
04/2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note „sehr gut“ (1,0)
Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung „sehr gut“ (1,49)

Beruflicher Werdegang:

07/2002 – 12/2003 AIP in der Kinderklinik St-Anna-Stifts Krankenhaus
in Ludwigshafen am Rhein
seit 01/2004 Assistenzärztin in der Kinderklinik des Diakonissen- und
Stiftungskrankenhauses in Speyer

Heidelberg, den

Unterschrift der Verfasserin

Danksagung

Für das interessante Thema und die ausgezeichnete Betreuung zu jeder Zeit möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. F. Zintl, und der Leiterin des KMT-Labors, Frau Dr. A. Müller, herzlich bedanken.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des hämatologisch-onkologischen Labors der Universitäts-Kinderklinik, den Mitarbeiterinnen des Institutes für Transfusionsmedizin und den Mitarbeiterinnen des Labors am Institut für Immunologie, die mir bei den Messungen und Auswertungen der Durchflusszytometrie und der MLC, sowie bei der Bestrahlung der Zellen behilflich waren und mir immer mit Ratschlägen und Hinweisen zur Seite gestanden haben, bin ich hierfür sehr verbunden.

Frau C. Wollenhaupt danke ich für die Hilfe bei der täglichen Laborroutine.

Meinem Mann danke ich für die unermüdliche Unterstützung und Hilfe in Computerfragen.

Meiner Familie, und insbesondere Herrn Dr. jur. Forek, danke ich für die Ermunterungen und motivierenden Worte, mit der sie zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders danke ich Frau Dr. Bettina Uebersezig dafür, dass ich einen Großteil der schriftlichen Arbeiten bei ihr in Bayreuth in Ruhe vollenden konnte.

Ehrenwörtliche Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. Felix Zintl, Dr. rer. nat. Angelika Müller,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für die Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Heidelberg, den

Unterschrift der Verfasserin